



UNIVERSIDADE da MADEIRA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXACTAS E ENGENHARIAS

Estudo da prevalência do vírus influenza A e B numa amostragem populacional do Arquipélago da Madeira

**DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM BIOQUÍMICA APLICADA**

Sílvia Cristina Sardinha Camacho

Orientador: Professor Doutor Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho
Co-orientador: Doutora Paula Luísa Fernandes

Setembro de 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Camacho, Sílvia Cristina Sardinha

Estudo serológico no comportamento do vírus influenza A e B na população do Arquipélago da Madeira.

Sílvia Cristina Sardinha Camacho – Funchal, 2012.

123 pp., 33 figuras, 35 tabelas

Orientador: Professor Doutor Miguel Ângelo Almeida Pinheiro de Carvalho

Co-orientador: Doutora Paula Luísa Fernandes

Dissertação (mestrado) – Universidade da Madeira – Mestrado em Bioquímica Aplicada

1. Influenza A. 2. Influenza B. 3. ELISA. 4. RT-PCR. 5. (H1N1) 2009.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Camacho, S.C.S. 2012. Estudo serológico no comportamento do vírus influenza A e B na população do Arquipélago da Madeira. Dissertação (Mestrado em Bioquímica, Especialidade em Bioquímica Aplicada), Universidade da Madeira, Portugal, 133 pp.

Quando for descoberto o remédio preventivo contra a gripe,
as gerações futuras nunca mais poderão nos entender.
Gripe é uma das tristezas orgânicas mais irrecuperáveis, enquanto dura.
Ter gripe é ficar sabendo de muitas coisas que, se não fossem sabidas,
nunca precisariam ter sido sabidas.
É a experiência da catástrofe inútil, de uma catástrofe sem tragédia.
É um lamento covarde que só outro gripado compreende.
Como poderão os futuros homens entender que ter gripe
nos era uma condição humana?
Somos gripados, futuramente sujeitos a um julgamento severo ou irônico.

Clarise Lispector *in* "A Descoberta do Mundo"

NORMALIZAÇÃO ADOPTADA

Esta dissertação está de acordo com as normas estabelecidas:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals indexed in Index Medicus (1992)*.

Universidade da Madeira. Regulamento específico do 2º ciclo em Bioquímica Aplicada.

LISTA DE ACRÓNIMOS E UNIDADES

BHQ1	- (do inglês, <i>black hole quencher-1</i>)
CC	- Centros Colaboradores (do inglês, <i>Collaborating Centres</i>)
CDC	- Centros de Controlo e Prevenção de Doenças (do inglês, <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CES	- Comissão de Ética para a Saúde
CLSI	- Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (do inglês, <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>)
CNG	- Centro Nacional da Gripe
CNI	- Centros Nacionais de Influenza (do inglês, <i>National Influenza Centres</i>)
CP	- <i>Crossing point</i>
cRNA	- Ácido ribonucleico complementar
Ct	- <i>Cycle threshold</i>
DGS	- Direcção-Geral da Saúde
ECDC	- Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doenças
ELISA	- Ensaio imunoenzimático indirecto
FAM	- 6-carboxifluoresceína
HA	- Hemaglutinina
IAV	- Vírus influenza A
IBV	- Vírus influenza B
IF	- Imunoflorescência indirecta
IgG	- Imunoglobulina G
IgM	- Imunoglobulina M
IH	- Teste de inibição da hemaglutinação
IMC	- Índice de massa corporal
INE	- Instituto Nacional de Estatística
INSA	- Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
IRA	- Infecções Respiratórias Agudas
LRE	- Laboratórios de Regulação Essencial (do inglês, <i>Essential Regulatory Laboratories</i>)
M1	- Proteína de matriz
M2	- Proteína do canal iónico
mRNA	- Ácido ribonucleico mensageiro
NA	- Neuraminidase
NEP	- Proteína de exportação nuclear
NLS	- Sinais de localização nuclear
NP	- Nucleoproteína

- NS1** - Proteína anti-interferão não estrutural
- NS2** - Proteína de exportação nuclear
- OMS** - Organização Mundial de Saúde (do inglês, *World Health Organization*)
- ONSA** - Observatório Nacional da Saúde
- ORF** - Fases de leitura aberta (do inglês, *open reading frame*)
- PA** - Proteína acídica
- PB1** - Proteína básica 1 da polimerase
- PB2** - Proteína básica 2 da polimerase
- PCR** - Reacção em cadeia da polimerase
- PRV** - Programa Regional de Vacinação
- r.p.m.** - Rotações por minuto
- RAM** - Região Autónoma da Madeira
- RF** - Factor reumatóide
- Rn** - Sinal fluorescente
- RNA** - Ácido ribonucleico
- RNP** - Ribonucleoproteína
- RT-PCR** - Reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa
- SESARAM** - Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira, E.P.E.
- ssRNA** - Ácido ribonucleico de cadeia simples de polaridade negativa (do inglês, *positive-sense single-stranded RNA*)
- TMB** - 3, 3', 5, 5' – tetrametilbenzidina
- TRDIs** - Testes Rápidos para Diagnóstico da Influenza
- VE** - Unidades Virotech
- vRNA** - Ácido ribonucleico viral
- vRNP** - Ribonucleoproteína viral

RESUMO

As infecções respiratórias de etiologia viral constituem um problema alarmante de Saúde Pública, sendo responsáveis pelo elevado e constante aumento dos índices de morbimortalidade registados no Mundo associados ao vírus influenza.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência dos anticorpos IgG e IgM em soros de utentes com requisições para análises serológicas ao vírus influenza A e B. Os utentes foram atendidos entre 1 de Abril de 2009 e 30 de Abril de 2011. Outro objectivo foi determinar a epidemiologia do vírus pandémico A (H1N1) 2009 nos indivíduos com sintomatologia de gripe durante o período entre Julho de 2009 e Julho de 2010 utilizando a técnica de RT-PCR em amostras de exsudado (ou aspirado) nasofaríngeo.

Tendo por base o universo de amostragem de 981 indivíduos, constatou-se que 10,7 e 8,2% da população analisada apresenta valores positivos de anticorpos IgM e IgG indicativos de infecção pelo vírus influenza A e B, respectivamente.

Constatou-se, também, que entre os 1934 indivíduos submetidos a procedimentos de diagnóstico laboratorial para a detecção de infecção pelo vírus pandémico A (H1N1) 2009, cerca de 747 (38,6%) estavam infectados.

Verificou-se que, a população mais jovem foi mais susceptível à infecção pelo vírus influenza A (H1N1) 2009. Isto difere da típica época de gripe sazonal, na qual as pessoas mais idosas estão mais propensas a tornarem-se infectadas e a desenvolver doença grave por influenza A e/ou B.

A prevalência de gripe na RAM é reduzida – um dos aspectos plausíveis que justifiquem esta afirmação poderá dever-se às características genéticas da população da RAM estudada. Embora seja de elevada relevância salientar que o Programa Regional de Vacinação (PRV) da RAM tem alcançado reconhecimento nacional e internacional devido às excelentes taxas de cobertura vacinal, fruto da atitude entre cidadãos e profissionais de saúde.

Palavras-chave: influenza A, influenza B, ELISA, RT-PCR, gripe pandémica (H1N1) 2009

ABSTRACT

Respiratory infections of viral etiology are an alarming problem in terms of Public Health and it is responsible for the high and increasing of morbidity and mortality rates recorded in the world associated with the influenza virus.

The present study aimed to evaluate the presence of IgG and IgM antibodies in patients serum with requests for viral serology analysis against influenza A and B. The patients were attended between April 1, 2009 and April 30, 2011. Another aim was to determine the epidemiology of the pandemic virus A (H1N1) 2009 of individuals with symptoms of influenza during the period between July 2009 and July 2010 by RT-PCR in samples of nasopharyngeal exudate (or aspirated).

The 981 samples analyzed allow us to conclude that 10.7 and 8.2% of the studied population of Madeira shows concentrations of positive IgM and IgG antibodies indicating the infection by influenza A and B, respectively.

It was found also that among 1934 individuals undergoing diagnostic laboratory procedures for detection of infection with pandemic virus A (H1N1) 2009, about 747 (38.6%) were infected. It was observed that the younger population was more susceptible to infection with influenza A (H1N1) 2009. This differs from a typical influenza A season, in which older people generally become infected and develop serious illness from influenza A and / or B.

The prevalence of influenza in the RAM is reduced – one of the plausible justifications of this claim may be due to genetic characteristics of the studied population of RAM. Although it is extremely important to note that the Regional Program of Immunization of RAM has achieved national and international recognition due to the excellent coverage rates, result of the attitude among citizens and health professionals.

Keywords: influenza A, influenza B, ELISA, RT-PCR, pandemic flu (H1N1) 2009

ÍNDICE

Ficha catalográfica	ii
Normalização adoptada	iv
Lista de acrónimos e unidades	v
Resumo	vii
Abstract	viii
Índice	ix
Capítulo 1. Enquadramento do projecto e objectivos	1
1.1. Justificativas	1
Capítulo 2. Revisão bibliográfica	3
2.1. O vírus	3
2.1.1. Classificação	3
2.1.2. Morfologia	4
2.1.3. Material genético	4
2.1.4. Ciclo de replicação	7
2.1.4.1. Adsorção do vírus influenza à célula hospedeira	7
2.1.4.2. Desempacotamento das ribonucleoproteínas virais (vRNPs) e transporte para o núcleo	8
2.1.4.3. Transcrição (produção de vRNA)	9
2.1.4.4. Replicação do genoma viral	10
2.1.4.5. Exportação das RNPs do núcleo	14
2.1.4.6. Produção das proteínas	14
2.1.4.7. Empacotamento do vírus	14
2.1.4.8. <i>Budding</i> e libertação de novos vírus	15
2.1.5. Estrutura antigénica	16
2.1.5.1. Hemaglutinina	16
2.1.5.2. Neuraminidase	17
2.1.6. Nomenclatura	17
2.1.7. Variação antigénica	20
2.1.8. Epidemiologia	21
2.1.9. Patogenia e patologia	22
2.1.10. Manifestações clínicas e complicações	23
2.1.11. Terapia e profilaxia	23
2.1.12. Diagnóstico	25
2.1.12.1. Ensaio imunoenzimático indirecto (ELISA)	27
2.1.12.1.1. Princípio do teste	28
2.1.12.1.2. Avaliação do teste	28
2.1.12.2. Reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)	30
2.1.12.2.1. Princípio do teste	30

2.2.	Aprovação pela Comissão de Ética	32
Capítulo 3.	Metodologia experimental	33
3.1.	Amostragem	33
3.1.1.	Identificação das amostras	33
3.1.2.	Colheita das amostras	33
3.1.2.1.	Detecção da infecção provocada pelo vírus influenza A e influenza B	33
3.1.2.2.	Detecção da infecção provocada pela gripe A (H1N1) 2009	34
3.2.	Métodos	35
3.2.1.	Teste ELISA	35
3.2.2.	Execução da RT-PCR	38
3.2.2.1.	Tratamento das amostras	38
3.2.2.2.	Extracção em coluna do RNA viral	39
3.2.2.3.	RT-PCR	40
3.3.	Análise estatística e exploratória dos dados	42
Capítulo 4.	Análise e interpretação dos resultados	44
4.1.	Detecção da infecção provocada pelo vírus influenza A e influenza B	44
4.1.1.	Taxa de prevalência	49
4.1.2.	Características demográficas	49
4.1.2.1.	Estrutura etária	50
4.1.2.2.	Estrutura sexual	54
4.1.3.	Distribuição geográfica	58
4.1.4.	Distribuição temporal	60
4.1.5.	Manifestações clínicas	62
4.1.6.	Infecções concomitantes	64
4.2.	Detecção da infecção provocada pela gripe A (H1N1) 2009	65
4.2.1.	Taxa de prevalência	66
4.2.2.	Características demográficas	67
4.2.2.1.	Estrutura etária	67
4.2.2.2.	Estrutura sexual	69
4.2.3.	Distribuição temporal	70
Capítulo 5.	Discussão	72
5.1.	Infecção pelo vírus influenza A e B	72
5.1.1.	Prevalência	76
5.1.2.	Características demográficas	78
5.1.2.1.	Estrutura etária	78
5.1.2.2.	Estrutura sexual	82
5.1.3.	Distribuição geográfica	85
5.1.4.	Distribuição temporal	88
5.1.5.	Manifestações clínicas	89
5.2.	Infecção pelo vírus pandémico A (H1N1) 2009	91
5.2.1.	Prevalência	92

5.2.2.	Características demográficas	93
5.2.2.1.	Estrutura etária	93
5.2.2.2.	Estrutura sexual	95
5.2.3.	Distribuição temporal	97
5.2.4.	Vacinação	99
Capítulo 6.	Considerações gerais e perspectivas futuras	100
6.1.	Considerações gerais	100
6.2.	Perspectivas futuras	101
Capítulo 7.	Agradecimentos	103
Capítulo 8.	Referências bibliográficas	105
Capítulo 9.	Anexos	118
9.1.	Ensaio imunoenzimático indirecto (ELISA)	118
9.1.1.	Conteúdo e composição do kit de teste de ELISA	118
9.1.2.	Esquema de realização do teste influenza A/influenza B ELISA IgG/IgM	119
9.2.	Reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)	119
9.2.1.	Conteúdo e composição do kit usado para a extracção de RNA viral do vírus da gripe A pandémica (H1N1) 2009	119
9.2.2.	Conteúdo e composição do kit usado na RT-PCR do vírus da gripe A pandémica (H1N1) 2009	120
9.3.	Estatística	121
	Gripe OT-4.1.	123

1. ENQUADRAMENTO DO PROJECTO E OBJECTIVOS

As Infecções Respiratórias Agudas (IRA) de etiologia viral constituem um problema alarmante de Saúde Pública, sendo responsáveis pelo constante incremento dos índices de morbimortalidade registados no Mundo [1] associados – apesar dos inúmeros serotipos de vírus responsáveis por estas infecções - ao vírus influenza. Tal situação deve-se, em parte, à sua elevada transmissibilidade entre indivíduos, sem respeitar faixas etárias. A diversidade de agentes etiológicos justifica que as IRAs representem, indubitavelmente, um dos maiores problemas da saúde pública mundial [1].

Numa perspectiva epidemiológica, a gripe continua a colocar grandes desafios sociais, clínicos e económicos, apesar dos progressos verificados na sua compreensão [2]. De facto, existe muita informação disponível sobre a história, estrutura e patogénese dos vírus influenza, embora continue a ser impossível prever quando e onde surgirá a próxima pandemia [2]. Nestas circunstâncias, a necessidade de identificar e controlar rapidamente estes agentes patogénicos particularmente perigosos, determina os esforços desenvolvidos na monitorização e vigilância das estirpes em circulação [3].

O presente estudo, realizado no âmbito do Mestrado de Bioquímica Aplicada, foi desenvolvido na Secção de Serologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça. Nesta secção realiza-se o diagnóstico serológico da infecção provocada pelo vírus influenza A e B, com recurso a técnicas de ensaio imunoenzimático (ELISA), imunoflorescência (IF) e a reacções em cadeia da polimerase seguidas por transcriptase reversa (RT-PCR).

1.1. JUSTIFICATIVAS

As doenças respiratórias representam 95% do total de enfermidades que acometem os seres humanos, atingindo entre 5 a 20% de indivíduos anualmente, apesar de ser uma das patologias mais estudadas na actualidade [4,5]. As epidemias iniciam-se e disseminam-se rapidamente, inviabilizando desta forma a adopção de medidas eficientes de controlo. Neste sentido, pretende-se que este projecto assuma um importante papel na compreensão da prevalência do vírus, estabelecendo procedimentos de controlo e prevenção do vírus, dado que, de acordo com estudos análogos, é praticamente impossível evitar a transmissão do vírus influenza.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as epidemias anuais de influenza infectam - em países desenvolvidos - cerca de 10 a 20% da população saudável, aumentando as taxas de hospitalização (associada à doença febril) ou em casos extremos, resultando na morte do indivíduo. Este desfecho ocorre em consequência de uma pneumonia primitiva despoletada pelo vírus influenza e/ou por infecções bacterianas oportunistas.

Deste modo, espera-se que este estudo constitua um contributo inédito sobre o tema na Região Autónoma da Madeira (RAM), preenchendo as lacunas existentes nesta área de investigação.

Neste contexto, o principal objectivo deste projecto é avaliar a prevalência do vírus influenza A e B numa amostragem populacional madeirense. Para tal, recorreu-se às técnicas de ELISA e RT-PCR para quantificar e identificar os agentes etiológicos causadores da doença nas amostras que entraram na Secção de Serologia do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, entre Abril de 2009 e Abril de 2011.

Os objectivos específicos deste estudo foram os seguintes:

- Estudar a distribuição da infecção nas diferentes faixas etárias;
- Analisar a distribuição da infecção de acordo com o sexo;
- Estudar a distribuição geográfica do vírus da gripe na RAM;
- Avaliar a sazonalidade e os picos de prevalência do vírus;
- Investigar os tipos de sintomas mais frequentes;
- Identificar e quantificar os tipos de vírus influenza;
- Avaliar a morbidade e mortalidade na comunidade;
- Descrever a realidade regional baseada no universo de utentes estudados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

" (...) uma infecção viral que afecta principalmente o nariz, garganta, brônquios e, ocasionalmente, os pulmões.

(...) é transmitida facilmente de pessoa para pessoa através de gotículas e partículas pequenas produzidas quando as pessoas infectadas tosse ou espirram".

OMS, Organização Mundial de Saúde

"As elevadas taxas de mutação e a facilidade de disseminação do vírus conduziram ao sucesso epidemiológico do vírus, responsável por 3 a 5 milhões de casos de doença grave e pela morte de 250.000 a 500.000 pessoas em todo o mundo, anualmente".

OMS, Organização Mundial de Saúde

" (...) a gripe continua a colocar grandes desafios sociais, clínicos e económicos, apesar dos imensos progressos verificados no conhecimento associado às ciências da saúde".

Andrade, 2005

O vírus influenza, popularmente designado "vírus da gripe" é o principal responsável por uma das doenças mais antigas e comuns conhecidas pelo Homem. As primeiras descrições de infecção pelo vírus influenza ocorreram por volta do século 5 a.C.. Hipócrates relatou casos de uma doença respiratória que, com uma duração de algumas semanas, foi responsável pela morte de indivíduos potencialmente infectados.

Estão datadas e documentadas, pelo menos, três pandemias (1918, 1957 e 1968), durante o século XX [6,7]. Em 1918 ocorreu uma pandemia causada pelo subtipo H1N1 que ficou conhecida como a gripe espanhola. Em 1957, o vírus H1N1 desapareceu, tendo surgido entretanto um novo vírus, o subtipo H2N2, responsável pela denominada gripe asiática. O surgimento do subtipo H3N2 em 1968 despoletou uma nova pandemia conhecida como a gripe de Hong Kong [8]. A primeira foi caracterizada como a pior pandemia da história, cuja mortalidade atingiu entre 50 a 100 milhões de indivíduos [7]. Esta pandemia foi referenciada como "O maior holocausto médico da história", estimando-se que tenha sido responsável pela morte de tantos indivíduos quanto os que faleceram aquando do surgimento da peste negra ou da Primeira Guerra Mundial [9].

2.1. O vírus

2.1.1. Classificação

O agente etiológico da gripe é o vírus influenza, *Myxovirus influenzae*, um membro da família Orthomyxoviridae. Os vírus influenza são classificados nos tipos A, B e

C, através das diferenças antigénicas entre duas das suas proteínas estruturais, nomeadamente a proteína de matriz (M1) e a nucleoproteína (NP). Ressalve-se que apenas os tipos A e B têm relevância clínica em humanos [10]. Os vírus influenza B e C não estão divididos em subtipos [10], o que não sucede com o vírus influenza A, cujos subtipos variam em função das características de duas glicoproteínas, designadamente hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) - presentes na superfície do envelope lipídico [10].

O vírus influenza A foi isolado pela primeira vez em 1933, enquanto o tipo B isolou-se em 1940 e o tipo C em 1950 [11].

2.1.2. Morfologia

Do ponto de vista morfológico, as partículas virais da influenza são esféricas, apresentando um diâmetro de 80 a 120 nm [12]. São pleomórficas, podendo ter formas esféricas ou filamentosas. As projecções exteriores da superfície do vírus, visíveis na figura 1, correspondem a duas glicoproteínas distintas, a HA e a NA. A superfície exterior do vírus é protegida por um envelope lipídico.

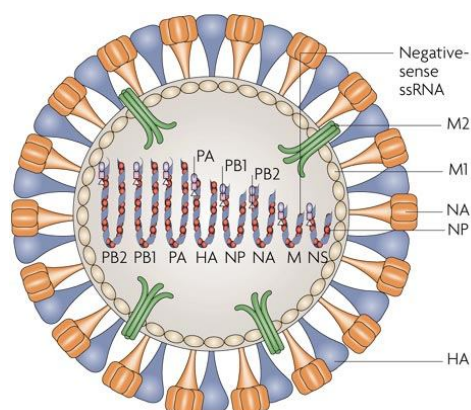


Figura 1. Esquema da estrutura do vírus influenza A [13]. (**PB2**: proteína básica 2 da polimerase; **PB1**: proteína básica 1 da polimerase; **PA**: proteína ácida da polimerase; **HA**: hemaglutinina; **NP**: nucleoproteína; **NA**: neuraminidase; **M**: proteína de matriz; **NS**: proteína não-estrutural; **M1**: proteína estrutural; **M2**: proteína do canal iónico).

2.1.3. Material genético

Oito segmentos de cadeia simples de polaridade negativa de RNA (-ssRNA) [7] compõem o genoma do vírus influenza A e B, enquanto o vírus influenza C é constituído por sete segmentos [14]. Estes segmentos são, por convenção, ordenados do tamanho

maior para o mais pequeno, embora o seu verdadeiro arranjo dentro do virião esférico seja desconhecido.

Estes segmentos codificam dez proteínas, nomeadamente os polipéptidos de polimerase (PB2, PB1 e PA), as glicoproteínas de superfície (HA e NA), a nucleoproteína (NP), a proteína de matriz (M1), a proteína do canal iónico (M2), a proteína anti-interferão não estrutural (NS1) e a proteína de exportação nuclear (NEP) [15].

Cada segmento está fortemente associado à NP formando uma nucleocápside helicoidal ou ribonucleoproteína (RNP). A cada segmento de RNP (RNA + NP) está associado um complexo polimerase contendo três polipéptidos: PB2, PB1 e PA. O complexo de RNA viral (vRNA), da NP, e das três proteínas da polimerase designa-se complexo da ribonucleoproteína viral (vRNP) [16].

Três segmentos, nomeadamente PB1, PB2 e PA, codificam as proteínas que formam o complexo polimerase. O gene da proteína básica 2 (PB2), com 2277 nucleótidos na região de codificação das proteínas no segmento 1, o gene da proteína básica 1 (PB1), com 2271 nucleótidos no segmento 2 e o gene da proteína acídica (PA), com 2148 nucleótidos no segmento 3 [13]. O primeiro segmento de RNA codifica a proteína PB2. A PB2, além de pertencer ao já referido complexo polimerase, actua durante o início da transcrição de mRNA viral ao reconhecer e ligar-se à estrutura *cap* de mRNA da célula hospedeira de forma a usar esse mRNA como *primer* para a transcrição de mRNA viral [17].

O segmento 2 de RNA codifica a proteína PB1. A PB1 representa a transcriptase, a qual catalisa a adição de nucleótidos durante a elongação do transcrito de RNA. A proteína PA constitui uma outra parte do complexo polimerase juntamente com PB2 e PB1, sendo codificada pelo segmento 3 e é essencial para a replicação do genoma viral; contudo, a sua função não é ainda conhecida [17].

Dois segmentos codificam as glicoproteínas de superfície do envelope que funcionam como antígenos virais: a hemaglutinina (HA cujo gene tem 1698 nucleótidos no segmento 4) e a neuraminidase (NA cujo gene tem 1407 nucleótidos no segmento 6) [13]. A primeira é responsável pela ligação do virião ao ácido siálico terminal dos receptores da célula hospedeira durante o processo de infecção, estando dividida em duas subunidades, HA1 e HA2 respectivamente. A NA está envolvida na libertação dos vírus pela célula infectada, catalisando a divisão entre as ligações glicosídicas e o ácido siálico na célula hospedeira, bem como, na superfície do vírus. Esta glicoproteína previne a agregação dos vírus facilitando assim a libertação dos novos vírus pelas células infectadas [10].

No segmento 5 é codificada a nucleoproteína (NP cujo gene tem 1494 nucleótidos). A proteína é transportada para o núcleo da célula hospedeira, onde se liga e encapsida o RNA viral [10].

O sétimo segmento codifica duas proteínas que são transcritas colinearmente: as proteínas de matriz M1 (gene com 756 nucleótidos) e M2 (gene com 291 nucleótidos). A M1 é a proteína mais abundante do virião influenza e forma um invólucro protector à volta das nucleocápsides virais dentro do envelope lipídico. No interior da célula hospedeira, é encontrada no citoplasma e no núcleo. A M1 não tem actividade enzimática conhecida, embora se acredite ser relevante na iniciação da montagem de novos vírus. A proteína M2 é outra proteína integral da membrana que serve igualmente como sinal de transporte para a superfície celular. Funciona como um canal de protões, com o intuito de controlar o pH do complexo de Golgi durante a síntese de HA, possibilitando desta forma, a acidificação do interior do virião e consequente libertação das RNPs após a entrada do vírus na célula hospedeira [10].

O segmento 8 é o menor segmento do genoma viral e codifica duas proteínas: a proteína anti-interferão não estrutural (NS1) (gene com 690 nucleótidos) e a proteína de exportação nuclear (NEP) (gene com 363 nucleótidos), posteriormente conhecida como NS2. Estas proteínas são abundantes na célula hospedeira, mas a NS1 não se encontra no virião. Ambas as proteínas têm funções na replicação e expressão viral, embora estas não sejam completamente conhecidas até à data. No entanto, sabe-se que a NS2 quando associada à matriz é responsável pelo transporte do complexo RNP do núcleo para o citoplasma, enquanto a NS1 afecta o transporte, tradução e *splicing* de RNA [13].

Recentemente foi descoberta uma nova proteína PB1-F2 codificada por uma fase de leitura aberta sobreposta na fase de leitura da PB1. Esta proteína com 87 aminoácidos parece participar na indução da apoptose e actua também na morte das células imunes do hospedeiro, respondendo às infecções virais da influenza. Esta proteína PB1-F2 demonstrou não ser essencial na replicação do vírus *in vitro* [16]. As principais funções de cada uma das proteínas resultantes dos transcritos dos segmentos do vírus influenza encontram-se sumariadas na tabela 1.

Tabela 1. Principais funções das proteínas resultantes dos transcritos dos 8 segmentos do genoma do vírus influenza [18].

Segmento de RNA	Designação da proteína	Tamanho (nº de nucleótidos)	Peso molecular da proteína (KDa)	Tamanho (nº de aminoácidos)	Função
1	PB2	2277	85,7	759	Subunidade de ligação ao <i>cap</i>
2	PB1	2271	86,5	757	Subunidade de elongação
3	PA	2148	84,2	716	Subunidade importante na replicação do genoma
4	HA	1698	61,5	566	Medeia a adesão do vírus às células
5	NP	1494	56,1	498	Conduz à ordenação helicoidal da nucleocápside
6	NA	1407	50	469	Libertação dos vírus
7	M1	756	27,8	252	Proteína estrutural
	M2	291	11	97	Canal iónico no envelope
8	NS1	690	26,8	230	Transporte do RNA celular, <i>splicing</i> e tradução
	NS2	363	14,2	121	Função desconhecida

2.1.4. Ciclo de replicação

2.1.4.1. Adsorção do vírus influenza à célula hospedeira

A adsorção ocorre por ligação específica de uma proteína do virião (anti-receptor) a um constituinte da superfície celular (receptor). As moléculas anti-receptoras podem ser proteínas, geralmente glicoproteínas (moléculas específicas) ou glicolípidos (menos específicos). Quando as partículas víricas da influenza entram em contacto com a célula hospedeira tendem a ligar-se aos grupos terminais do ácido N-acetil neuramínico (ácido siálico) dos receptores celulares através da HA [19].

A ligação da HA aos receptores induz a entrada do vírus na célula hospedeira por endocitose mediada por receptores formando-se um endossoma. Embora tenham sido reportadas outras formas de entrada dos vírus influenza nas células, a via endocitária, ilustrada pela figura 2, parece ser a mais comum [20,16]. A partir da adsorção do virião a uma área da membrana celular contendo receptores, esta última dobra-se para dentro por acção de proteínas celulares específicas (clatrininas), formando uma vesícula citoplasmática. Os viriões, então, podem ser encontrados dentro destas vesículas intracelulares recém-formadas.

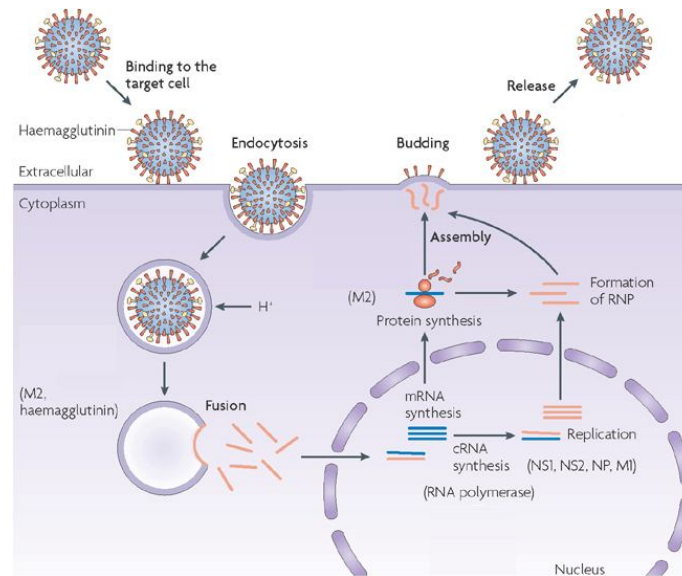


Figura 2. Esquema ilustrativo do ciclo de replicação do vírus influenza [21].

2.1.4.2. Desempacotamento das ribonucleoproteínas virais (vRNP) e transporte para o núcleo

Os eventos que ocorrem após a penetração do vírus designam-se por desempacotamento. Neste, o capsídeo é removido e o genoma viral é exposto, geralmente sob a forma de um complexo nucleoproteico. No caso dos vírus que são replicados no núcleo, o genoma está frequentemente associado à NP, devendo ser transportado através da membrana nuclear. O capsídeo é transmovido ao longo do citoesqueleto, desde o sítio de entrada até ao poro nuclear. Nesse momento, o RNA viral é libertado para dentro do núcleo com a desintegração do capsídeo vazio [16].

O mecanismo de desempacotamento envolve a interação do envelope viral com a membrana endossomal. A etapa chave é a acidificação do conteúdo do endossoma [22]. Os endossomas são acidificados pela célula até pH 5,0, causando um rearranjo na cadeia proteica da hemaglutinina, com a exposição de sítios hidrofóbicos normalmente escondidos (péptidos de fusão). Os monómeros da hemaglutinina são clivados, levando à formação de dois polipéptidos, o HA1 e o HA2 [22]. A cadeia HA1 contém regiões que são utilizadas na ligação dos receptores celulares com ácido siálico. Após a internalização do vírus, o pH baixo induz alterações conformacionais na cadeia HA1, permitindo a fusão do péptido com a N-terminação da cadeia HA2, promovendo a fusão entre as membranas do vírus e da célula e, subsequentemente a passagem do nucleocapsídeo viral para o

citoplasma. Por fim, o endossoma funde-se com um lisossoma, onde os restos virais são destruídos [22].

As ribonucleoproteínas (RNPs) são libertadas do endossoma quando o pH endossomal diminui até 5,0, activando os canais iónicos virais (as proteínas M2), responsáveis pelo transporte dos prótons para o interior da partícula vírica, promovendo o desempacotamento, através da destabilização as proteínas de matriz (M1) [16]. As proteínas víricas M1 sofrem então mudanças conformacionais, seguidas pela disrupção das interacções M1 – vRNP e rearranjos conformacionais na hemaglutinina. As membranas viral e endossomal fundem-se e as vRNPs individuais são libertadas para o citoplasma celular [16].

A importação para o núcleo através do poro nuclear é mediada por sinais de localização nuclear (NLS), realizado pelas NP. As partículas virais incapazes de se fundir com a membrana, a exemplo dos viriões com defeito nos canais de iões M2, são degradados nos lisossomas [16].

2.1.4.3. Transcrição (Produção de vmRNA)

O processo de transferência da informação específica do RNA viral para o RNA mensageiro (mRNA) é designado por transcrição. Contrariamente à maioria dos vírus RNA de senso negativo, nos quais a síntese de mRNA ocorre no citoplasma, a transcrição do genoma dos vírus influenza ocorre no núcleo das células infectadas [23]. Os vírus com polaridade negativa possuem uma RNA polimerase para sintetizar mRNA.

O vírus influenza é um vírus RNA de senso negativo. Como tal, o patogénio necessita de converter o seu próprio genoma senso negativo numa cadeia senso positiva que é utilizada como matriz na formação de múltiplas cadeias de RNA de senso negativo para os viriões recém-formados. Neste processo, o vírus submete o aparelho de transcrição da célula hospedeira, utilizando essencialmente a estrutura *cap* 5' do mRNA das células no início da transcrição do RNA de senso positivo. O restante mRNA do hospedeiro é clivado por endonucleases. A replicase viral copia a cadeia de senso negativo para produzir um RNA viral *capped* (cadeia positiva) [24]. No núcleo, os segmentos de RNA são transcritos pelas proteínas (PB2, PB1 e PA) da RNA polimerase associada a cada segmento [25]. Nos vírus com genomas fragmentados, cada segmento dá origem ao seu próprio mRNA. O passo inicial da transcrição consiste na ligação da PB2 ao *cap* do mRNA celular, através de um mecanismo designado "*cap-snatching*" [19], no qual a endonuclease viral PB2 cliva o fragmento *cap* 5' acompanhado de 10 a 15 nucleótidos seguintes de mRNA [19]. Interessa referir que o *cap* consiste num nucleótido

trifosfatado de guanina que se liga à extremidade 5' do mRNA. O fragmento *cap* 5' funciona como *primer* na síntese do RNA viral de sentido positivo, realizada pela PB1, até encontrar o sinal existente no RNA viral que determine a poliadenilação. A poliadenilação do mRNA viral é pouco vulgar. O sinal de poliadenilação é uma sequência de 5-7 uridinas na extremidade 3' do RNA viral, a qual é repetidamente copiada até se obter cerca de duzentos A [26]. Findo este processo, o mRNA viral é libertado possuindo um *cap* do mRNA celular e uma cauda poliadenilada.

2.1.4.4. Replicação do genoma viral

Três tipos de RNA viral são sintetizados no núcleo celular. São eles o 1) mRNA viral de polaridade positiva (mRNA), 2) o RNA genómico viral (vRNA) de polaridade negativa, e 3) o RNA complementar (vcRNA) de polaridade positiva [16] (figura 3).

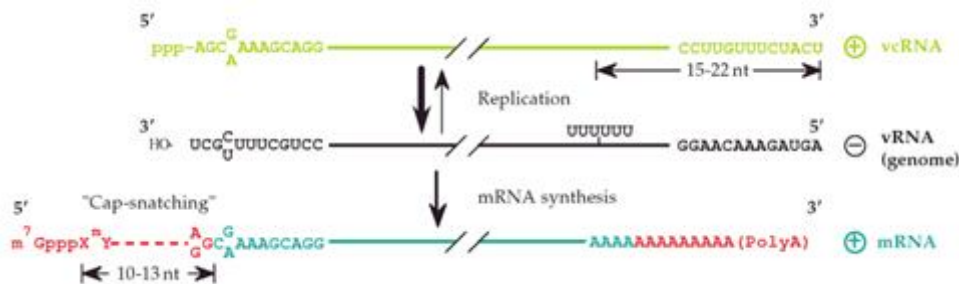


Figura 3. Relação entre o RNA genómico (vRNA), o mRNA e o vcRNA do vírus influenza [27].

Uma vez estabelecida a síntese de mRNA, parte do RNA sintetizado é dedicada à produção de cópias de sentido positivo de todo o genoma viral, conhecida como RNA complementar (vcRNA) [23].

A replicação do genoma viral ocorre através de um processo representado por dois passos. Primeiramente, uma cópia de sentido positivo do vRNA (cRNA) é produzida, dado que os transcritos mRNA são cópias incompletas do vRNA e, subseqüentemente, não podem ser usadas como substratos para a síntese genómica [28]. Desta forma, a síntese de vRNA ocorre através de um cRNA intermediário que, por sua vez, é usado como matriz para produzir mais RNA genómico (vRNA)(-), enquanto que os vRNAs recentemente replicados são usados para a produção de mais vmRNAs e cRNAs [29]. Contrariamente ao mRNA, a síntese de cRNA envolve uma iniciação sem *primer* e uma leitura do sinal de poliadenilação para produzir cópias inteiras de vRNA *template* [23].

O mecanismo de *switching* entre a transcrição e a replicação do genoma do vírus da gripe, tem sido objecto de estudo, nomeadamente no que concerne aos factores

moleculares envolvidos e o seu papel na regulação da síntese de RNA viral. Inoportunamente, o mecanismo de síntese de cRNA, um componente menor mas crucial na síntese total de RNA viral, ainda não é conhecido [23]. Todas estas reacções são catalisadas pelo complexo RNA polimerase, embora as funções de cada subunidade nas diferentes etapas do processo sejam distintas. O complexo RNA polimerase é responsável tanto pela transcrição como pela replicação do vRNA genómico [29], existindo aproximadamente 30 a 60 cópias desta polimerase por vírus. O complexo é composto por 3 proteínas (PB1, PB2, e PA), designadas colectivamente proteínas P (P de polimerase). A denominação atribuída à PB1, PB2 e PA deriva das condições em que estas proteínas foram isoladas, sendo que A refere-se a ácido e B a base. A transcrição do RNA envolve as proteínas PB1 e PB2 e a replicação do genoma requer as subunidades PB1 e PA do complexo RNA polimerase [16].

A síntese do RNA requer quatro proteínas virais: as três subunidades da RNA polimerase e a proteína de ligação NP [23]. A actividade do complexo polimerase é bem conhecida, durante a transcrição dos segmentos vRNA, embora as funções das proteínas PB1 e PB2 estejam melhor caracterizadas do que as de PA.

A subunidade PB2 desempenha um papel vital na transcrição do mRNA, tendo como função primordial a ligação entre a estrutura *cap* 5'-metilada e o pré-mRNA da célula hospedeira antes de serem clivados para fornecer *primers* para a síntese de mRNA viral [23]. A separação endonucleotídica da estrutura *cap* é função, em parte, da PB2 [17] que se liga às estruturas *cap* 5'-metiladas do mRNA celular e cliva 10 a 15 nucleótidos da extremidade 5' do mRNA [19]. A PB2 é recrutada para o complexo polimerase através das interacções proteína-proteína com a subunidade PB1, também interage directamente com a NP, mas aparentemente não com a PA [23]. Esta proteína liga-se às proteínas NP e PB1 por sítios de ligação separados [26]. Contrariamente à sua função na transcrição, o papel da PB2 na replicação do genoma viral é menos claro e um tanto controverso. Alguns estudos concluíram que a PB2 não é requerida na replicação genómica [30, 31, 23]. Outros estudos reportaram que todas as três subunidades da polimerase são requeridas para constituir um complexo polimerase activo [32, 33, 23]. As tentativas de identificação das regiões da PB2 responsáveis pela ligação às estruturas *cap* da célula hospedeira resultam em observações contraditórias. O uso de RNPs virais purificados permitiu aferir que existem duas regiões de ligação na sequência PB2, mapeados nos aminoácidos 242-282 e 538-577 [34, 23]. Mais recentemente, identificou-se apenas um peptídeo abrangendo os aminoácidos 544-556 [35]. As interacções entre a PB2 e as proteínas hospedeiras podem ser específicas da espécie e, potencialmente, tem um papel na

definição da gama de hospedeiros [26]. A proteína PB1, a maior das duas proteínas básicas, codificada pelo segmento 2, actua como a âncora do complexo polimerase, contendo sítios de ligação independentes para a PB2 e PA, sendo igualmente capaz de ligar-se à NP [23].

Aplicações de *cross-linking* com ultra-violeta têm sido amplamente utilizadas na análise da actividade de ligação da PB1 e corrobora o seu papel central na função polimerase. Segundo um estudo realizado, o polipéptido foi encontrado em estreita associação com os nucleótidos acrescentados à extremidade 3' do *primer* durante a iniciação e alongação da transcrição do mRNA [23], funcionando como uma RNA-polimerase/RNA dependente na catálise da alongação da cadeia de RNA [26]. Estes dados fornecem evidências de que PB1 é de facto responsável pela adição sequencial dos nucleótidos, durante o alongamento da cadeia de RNA. A PB1 é uma endonuclease responsável por iniciar a transcrição e a replicação ligando-se às extremidades 3' e 5' do RNA viral (vRNA) e do RNA complementar (cRNA), respectivamente [26]; formando os aminoácidos 508 a 522, o sítio activo [35, 23].

A terceira subunidade do complexo polimerase, a PA, é a menos conhecida das subunidades da polimerase em termos funcionais, embora alguns estudos indiquem que estará envolvida na transcrição e replicação do RNA viral [36]. Ainda não foi identificado nenhum papel específico na transcrição ou replicação do vírus influenza, embora trabalhos com mutantes sugiram o seu envolvimento na replicação do vRNA [23]. A interacção da PA com PB1 está implicada na transcrição, [36, 23] nomeadamente na alongação [26]. A função melhor caracterizada da PA é a sua associação com a actividade proteolítica, especulando-se que a actividade proteolítica da PA possa estar envolvida na libertação das RNPs da matriz nuclear, permitindo o seu transporte para o citoplasma [37].

O último componente das proteínas virais requerido na síntese viral de RNA é a NP (nucleoproteína), uma proteína básica que se liga à cadeia simples de RNA sem sequência específica [38]. A análise das interacções NP-RNA indicam que uma molécula de NP liga-se a aproximadamente 25 nucleótidos de uma cadeia de RNA [39]. Esta nucleoproteína interage com o complexo polimerase através de *links* directos com ambas as subunidades PB1 e PB2, mas não parece estabelecer contactos com a subunidade PA [40]. Adicionalmente, crê-se que a NP associa-se a um grande número de outras proteínas, tendo sido identificadas interacções com as proteínas virais PB1, PB2 e M1. A interacção da NP com a M1 serve para controlar tanto a actividade transcripcional das RNPs como o seu tráfego intracelular [23]. A proteína NP desempenha um papel essencial na arquitectura da RNP, nomeadamente na construção dos complexos vRNP [16], na

transcrição e na replicação do genoma viral, dado que a polimerase não consegue usar efectivamente todo o genoma viral como matriz. Concomitantemente, a NP está implicada na regulação do *switch* entre a transcrição e a replicação do genoma [23]. Experiências evidenciaram a ligação entre NP durante o alongamento das cadeias [16]. A adição de NP durante a síntese das novas cadeias, forma o sinal de poliadenilação não reconhecido ocorrendo, a síntese de todo o segmento do genoma viral. As proteínas NP promovem também a iniciação da transcrição *sem primer* e bloqueiam a síntese de mRNAs virais [16]. A acumulação de NP no núcleo induz o ciclo replicativo do vRNA. Nesta situação tanto na produção do cRNA como no vRNA não é necessário um *primer* (logo não intervém a PB2), começando a subunidade PB1 a polimerização da cadeia complementar, onde há sucessivamente a adição de NP à cadeia em crescimento [16]. A NP é fosforilada, estando o padrão de fosforilação dependente das células hospedeiras e relacionado com a gama de hospedeiros do vírus [17].

Adicionalmente, a NP é o alvo principal da resposta citotóxica por parte dos linfócitos T do hospedeiro, gerados após a infecção por todos os subtipos de influenza [17].

No vírus influenza A e B, dez proteínas resultam da expressão dos genes nos oito segmentos do genoma [15], dos quais seis codificam uma proteína viral, e os restantes dois contêm duas fases de leitura aberta (em inglês *open reading frame*, ORF), codificando alternadamente as proteínas M1 e M2 e as proteínas NS1 e NS2 [16]. A síntese de RNA ocorre no núcleo possibilitando o *splicing* diferencial observado em dois dos mRNA [27] (figura 4). Os segmentos 7 e 8 codificam, cada um, duas proteínas devido ao *splicing*. A M2 e a NS2 são os produtos *spliced* e geralmente são encontrados em muito menor abundância que M1 e NS1 [19].

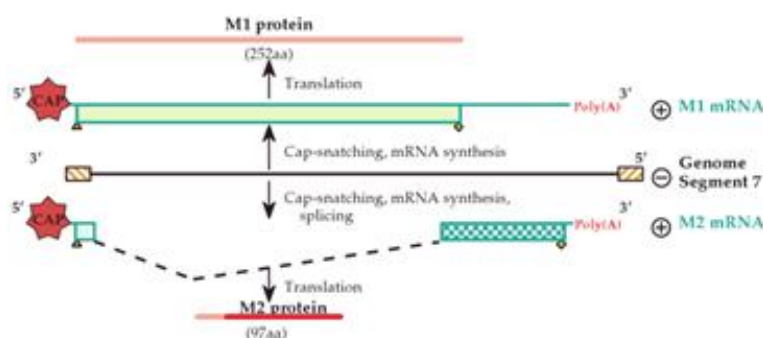


Figura 4. Síntese de dois mRNA para as proteínas M1 e M2 do segmento genómico 7 do vírus influenza [27].

2.1.4.5. Exportação das RNPs do núcleo

Os mRNAs virais sintetizados são exportados do núcleo para o citoplasma via poros nucleares, num processo auxiliado pelas proteínas M1 e NS2 [19]. Apenas as vRNPs de senso negativo são exportadas do núcleo [19].

2.1.4.6. Produção das proteínas

Nesta fase as proteínas PB2, PB1, PA, NP, NS1, NS2, e M1 são produzidas no citoplasma celular [16]. A síntese das proteínas M2, HA e NA é realizada por ribossomas ligados às membranas do retículo endoplasmático. Posteriormente estas proteínas serão inseridas no retículo endoplasmático, glicosiladas e transportadas para o aparelho de Golgi [25]. Todos os outros mRNAs vão ser traduzidos por ribossomas citoplasmáticos.

As proteínas PB2, PB1, PA e NP são importadas para o núcleo onde catalisam toda a síntese de cRNA (+) e posteriormente de vRNA (-), ambas sintetizadas sobre a forma de vários fragmentos de nucleocápsides [25]. Uma vez sintetizadas novas cadeias de vRNA, entram para a via de síntese de novos mRNAs. As proteínas M1 e NS1 são igualmente transportadas para o núcleo.

2.1.4.7. Empacotamento do vírus

Após a replicação do RNA viral e a síntese das suas proteínas, estas moléculas agrupam-se no núcleo da célula hospedeira para formar complexos de vRNPs [16] que migram para a membrana celular. É o resultado da ligação das proteínas PB1, PB2, PA, NP e NS2 de novo aos vRNAs.

As moléculas de M1 ligam-se a novos RNAs virais formando os complexos M1-vRNP [16], e catalisam o transporte das vRNPs para o citoplasma induzindo a paragem da síntese de novos mRNAs virais. As moléculas de NS2 promovem a exportação nuclear das novas vRNPs para o citoplasma. As M1 também inibem a importação dos complexos de vRNP, impedindo as recém-sintetizadas vRNPs associadas à proteína M1 de retornar ao núcleo [16]. As proteínas HA, NA e M2 são transportadas para a superfície da célula sendo incorporadas na membrana plasmática, formando posteriormente o envelope. As nucleocápsides víricas associadas às proteínas M1 e NS2 são transportadas para a superfície celular associando-se às regiões da membrana plasmática que contém as proteínas virais [25].

O empacotamento dos vírus é finalizado com a incorporação ("*budding*") da membrana plasmática que ao fechar-se liberta os viriões recém-sintetizados.

2.1.4.8. *Budding e libertação de novos vírus*

Após o abandono do núcleo, o vírus forma partículas víricas e sai da célula. Como a influenza é um vírus envelopado, utiliza a membrana plasmática da célula hospedeira para formar as partículas víricas que saem da célula e vão infectar as células vizinhas [19].

O processo de abandono das células inicia-se com a interacção entre os complexos vRNP-proteína M1 e as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas M2, HA, e NA, estabelecendo uma ligação entre os componentes do interior do vírus e as proteínas da membrana [18]. Este processo conduz à formação de um broto no local de montagem - a membrana apical das células epiteliais polarizadas [16]. Este broto separa-se da membrana celular ocorrendo a libertação de um virião no meio extracelular. A montagem das proteínas víricas e o RNA produz novos vírus que se libertam da célula infectada através da incorporação ("*budding*") da membrana plasmática da célula infectada, permitindo, conseqüentemente, a dispersão dos vírus recém-sintetizados para as células vizinhas.

Algumas análises mutacionais e de deleção demonstraram que a cauda de M2 é extremamente importante na formação de partículas víricas [19]. A M1, presente sobre a bicamada lipídica, é importante no passo final de fecho e incorporação ("*budding*") da partícula vírica [19]. A neuraminidase viral permite a libertação do vírus da célula hospedeira.

A clivagem dos resíduos de ácido siálico das glicoproteínas e glicolipídios constitui um passo determinante que deverá ocorrer previamente à saída das partículas víricas recém-sintetizadas através da membrana plasmática [24]. A NA remove enzimaticamente estes resíduos terminais do ácido siálico da estrutura glicana na superfície da célula infectada, promovendo a libertação dos novos vírus e a sua dispersão para as células vizinhas não infectadas. Sem este processo, a partícula vírica não será libertada pela membrana plasmática [19].

O mecanismo de empacotamento responsável pela escolha dos 8 vRNP distintos que compõem o vírus influenza numa só partícula é desconhecido. A análise dos referidos complexos moleculares demonstra que estes são apinhados de uma maneira não específica e incerta [16]. No entanto, estão descritos dois modelos hipotéticos que explicam o empacotamento dos segmentos genómicos virais dentro dos vírus, nomeadamente o modelo de empacotamento aleatório e o modelo de empacotamento específico [19]. O primeiro prevê que os segmentos genómicos virais são aleatoriamente empacotados dentro dos vírus; enquanto o último prevê a existência de sinais presentes nos segmentos virais que ditam o seu empacotamento no vírus [19].

2.1.5. Estrutura antigénica

Duas classes de antigénios existem nos vírus influenza: os internos e os superficiais. A NP e a M1 são sobretudo, antigénios internos específicos de cada tipo de influenza, enquanto os antigénios superficiais são constituídos pela hemaglutinina e neuraminidase.

2.1.5.1. Hemaglutinina

O principal antigénio de superfície do vírus é um trímero com extensão de 135 Å de comprimento fora do envelope [41]. Cada monómero consiste em duas subunidades ligadas por uma ponte dissulfídica, a HA1 e a HA2 [42], produzidas durante a infecção pela clivagem do precursor biossintético, HAO [41]. Esta clivagem gera a região carboxil-terminal de HA1 e a amino-terminal da HA2, determinantes na actividade de fusão com a membrana, como consequências do carácter infeccioso do vírus [41].

Estes homotrímeros formados durante a maturação consistem numa haste e numa extremidade globular, cujo glóbulo é constituído pela HA1 e compreende o local de ligação aos receptores da célula hospedeira, assim como, a maioria dos alvos antigénicos da molécula. A haste é formada pela HA2 e parte de HA1 e contém a sequência hidrofóbica transmembranar e uma âncora citoplasmática. A HA está ancorada à membrana viral *via* C-terminal da subunidade HA2 [42].

As cadeias HA1 estendem-se desde a base da molécula, através de uma haste fibrosa, até à região distal da membrana que contém os sítios de ligação do receptor e os sítios de ligação dos anticorpos de neutralização da infecciosidade [41].

A análise de variantes virais possibilitou a identificação de cinco áreas antigénicas na região globular HA1 de cada monómero, denominados pelas letras A a E, envolvidos na neutralização viral pelos anticorpos. Esses *loci* são passíveis de sofrer mutações, sendo as regiões de maior variabilidade da HA. Os demais sítios de HA1 são conservados, condição necessária para manter a estrutura e função da molécula [43]. As elipses indicadas na figura 5 correspondem às localizações das cinco áreas antigénicas (A, B, C, D e E) na região globular das moléculas monoméricas e triméricas da hemaglutinina.

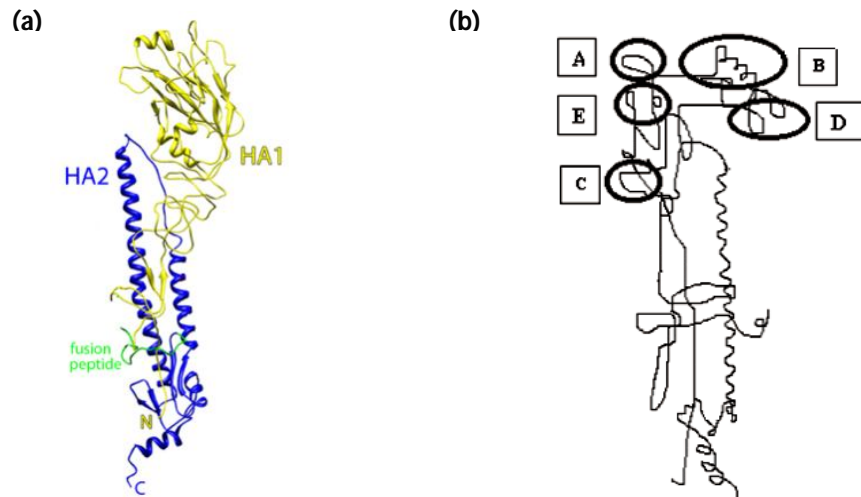


Figura 5. Estrutura monomérica da hemaglutinina de influenza A [43, 44].

2.1.5.2. Neuraminidase

A NA é uma glicoproteína de membrana integral tipo II com actividade enzimática que é vital para a dispersão do vírus pelas células hospedeiras [45]. A NA com 469 aminoácidos tem pelo menos, cinco possíveis sítios de glicosilação [45].

A NA é normalmente uma proteína homotetramérica em forma de cogumelo e possui actividade N-acetil-neuraminosil-glicohidrolase [45]. Esta proteína pode ser dividida em quatro regiões principais, incluindo uma cauda hidrofílica curta amino-terminal, um domínio transmembranar hidrofóbico, uma haste e uma cabeça globular que contém o sítio activo da enzima [45].

O segundo antígeno mais importante da superfície do vírus hidrolisa os ácidos siálicos terminais dos sialoglicanos. A NA promove a libertação de novos vírus a partir da célula hospedeira infectada [46]. A NA pode promover a adesão do vírus às células epiteliais respiratórias humanas [47]. A degradação da mucina no tracto respiratório pela NA viral pode expor os receptores do hospedeiro e promover a ligação do vírus [45].

2.1.6. Nomenclatura

As propriedades antigénicas das duas glicoproteínas de membrana do vírus influenza, a HA e a NA estão na base da classificação dos vírus influenza A [48,49]. Os subtipos de hemaglutinina e de neuraminidase são usados para classificar as diferentes linhagens do vírus influenza do tipo A e as combinações que resultam em diferentes gamas de hospedeiros e de virulência [24].

Estudos de imunodifusão permitiram identificar a existência de 16 subtipos de HA serologicamente distintos, os quais diferem entre si na constituição aminoacídica, denominados como H1 a H16 e 9 subtipos antigénicos de NA, denominados N1 a N9, os quais são serologicamente distintos [50]. Esta classificação antigénica é baseada nas reacções com soros hiperimunes anti-HA e anti-NA e foi reforçado pela sequenciação dos genes virais para HA e NA [49]. Comparações das sequências também indicam uma subdivisão das HAs em dois grupos principais e cinco clades, como se pode observar na figura 6, as quais são a H11, H13 e H16, a H8, H9 e H12, a H1, H2, H5 e H6, a H3, H4 e H14 e a H7, H10 e H15 [51]. Os nove subtipos de NA também formam dois grupos sem qualquer relação genética óbvia com os grupos de HA [51].

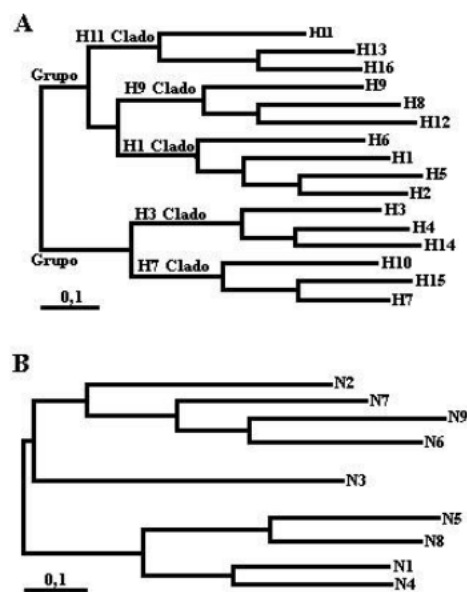


Figura 6. Filogenia dos 16 subtipos de HA (A) e dos 9 subtipos de NA (B) [52].

As estirpes do vírus influenza detectadas nas várias regiões do globo são classificadas e catalogadas de acordo com um código oficial da OMS. Assim de modo a denominar os vírus isolados, tem-se em conta as seguintes características: 1) o tipo antigénico da NP (A, B ou C); 2) o hospedeiro de origem (ex: suíno, equino ou aviário) quando não especificado que o vírus tem origem humana; 3) a localização geográfica do primeiro isolamento (ex: Texas, Taiwan, Beijing ou Sydney); 4) o número laboratorial da estirpe, atribuído de acordo com a ordem cronológica na qual a estirpe foi isolada, em determinada localidade e 5) o ano de isolamento. Para além disso, o vírus influenza tipo A, os subtipos de HA e NA são discriminados entre parênteses.

Assim, a estirpe A/Sydney/5/97 (H3N2) é uma variante do tipo A, de origem humana, isolada na cidade de Sydney em 1997, com os antigénios de superfície H3 e N2

[53]. Os reservatórios naturais do vírus influenza A são os mamíferos e aves [10], tendo já sido isolados uma variedade de subtipos a partir de porcos, cavalos e, inclusive, de mamíferos marinhos [14]. Os vírus influenza B e C foram isolados quase exclusivamente de humanos, apresentando potencial patogénico apenas para o Homem sem grandes implicações, portanto, na epidemiologia.

A tabela 2 torna evidente que, os 16 subtipos de hemaglutinina encontram-se perpetuados em aves aquáticas por todo o mundo, mas apenas dois, o H5 e o H7, evoluem de modo a tornar o vírus numa variante de alta patogenicidade para o referido grupo de aves.

Apenas três subtipos de HA e dois de NA (H1-3 e N1-2) têm circulado nos humanos desde 1918 [10]. Os subtipos H1, H2 e H3 foram responsáveis por pandemias ou epidemias no Homem. Os subtipos H5, H7 e H9 são transmissíveis a humanos, sendo que a variante Asiática de H5N1 é susceptível de causar mortalidade [17]. Nos cavalos, apenas dois subtipos de influenza A (H7N7 e H3N8) são encontrados, enquanto os subtipos recuperados dos porcos na natureza são H1, H3, N1 e N2 [54]. Partículas víricas subtipadas como H7N7 foram encontradas em grandes concentrações nos pulmões de focas [54]. Outra linhagem de vírus influenza A isolada destes mamíferos foi o subtipo H4N5 [54]. Os subtipos H13N2, H13N9 e H1N3 também foram isolados dos pulmões de baleias [54].

Tabela 2. Distribuição dos subtipos HA e NA do vírus influenza A isolados de humanos, mamíferos e aves.

HEMAGLUTININA					NEURAMINIDASE				
H1					N1				
H2					N2				
H3					N3				
H4					N4				
H5					N5				
H6					N6				
H7					N7				
H8					N8				
H9					N9				
H10									
H11									
H12									
H13									
H14									
H15									
H16									

Os vírus influenza B podem ser divididos em duas linhagens antigenicamente distintas, representadas por B/Victoria/2/87 (linhagem-V) e B/Yamagata/16/88 (linhagem-Y), baseado em testes de inibição da hemaglutinação (HI) [55]. A primeira linhagem tem circulado desde 1976 e a segunda foi reconhecida na maior parte do mundo desde 1987 [55]. Desde o ano 2000, as duas linhagens co-circulam pelo mundo em proporções variáveis em diferentes países ou regiões e diferentes épocas, dificultando desta forma a previsão da sua prevalência futura e as recomendações para a composição da vacina. A co-circulação destas linhagens também resultou no surgimento e posterior circulação mundial de um vírus B recombinante possuindo um HA da linhagem-Victoria com um NA da linhagem-Yamagata [56].

2.1.7. *Varição antigénica*

Os vírus influenza estão sujeitos a dois tipos de variações antigénicas responsáveis pela sua habilidade em causar epidemias anuais recorrentes e menos frequentemente pandemias: os *drifts* e os *shifts* antigénicos [14]. As variações antigénicas menores ou *drifts* antigénicos ocorrem, em média, a cada dois ou três anos para os subtipos do vírus influenza A e a cada cinco ou seis anos para os vírus influenza B [53]. Estas variações são causadas pela acumulação de mutações pontuais nos genes HA e NA [14] que resultam na alteração gradual da estrutura das proteínas. Esta alteração reduz a ligação aos anticorpos e subseqüentemente a imunidade pré-existente do hospedeiro resultando numa melhor disseminação da influenza conduzindo ao desenvolvimento de uma nova epidemia [57]. Os vírus influenza A também exibem *shift* antigénico, uma forma mais dramática de mudança antigénica nas glicoproteínas de superfície [14]. Estas variações antigénicas maiores, específicas da influenza A, estão associadas à completa substituição de um ou ambos os segmentos do genoma viral [53]. Estas alterações devem-se ao reagrupamento entre vírus de humanos e de outras espécies animais que co-infectam a mesma célula hospedeira facilitando, desta forma o surgimento de rearranjos no material genético. Os referidos rearranjos tornam possível que o vírus possua segmentos das duas estirpes [57], ocasionando novas estirpes imunologicamente diferentes das estirpes circundantes.

As grandes variações antigénicas destas novas estirpes ocorrem em populações com pouca ou nenhuma imunidade, potenciam o aparecimento de pandemias associadas a taxas de morbimortalidade inevitavelmente elevadas. Exemplo disso são as três grandes

pandemias do século XX, a espanhola (1918), a asiática (1957) e a de Hong Kong (1968), que resultaram em milhões de mortes durante os surtos da gripe [53]. Os vírus influenza do tipo B cuja variedade de reservatórios animais é mais restrito e limitado não apresentam grandes variações genéticas [57].

2.1.8. Epidemiologia

A influenza é uma doença respiratória aguda altamente contagiosa de importância global responsável pelo surgimento de epidemias e pandemias durante séculos [57].

As pandemias provocadas pelo vírus influenza são eventos raros e irregulares, espaçadas geralmente por 30 a 40 anos [53]. Por sua vez, as epidemias de gravidade variável tendem a ocorrer sistematicamente a cada 1-3 anos, e predominantemente no Inverno [53].

Estas pandemias e epidemias atingem indivíduos de todas as faixas etárias num curto espaço de tempo, num processo determinado pela elevada variabilidade e capacidade de adaptação do vírus [53]. A natureza fragmentada do genoma da influenza induz taxas elevadas de mutação durante a fase de replicação, particularmente nos genes da HA e NA. A HA sofre mutações com uma taxa estimada de 2×10^{-3} substituições de bases por posição por geração de vírus [54]. As taxas de mutação elevadas e a facilidade de disseminação do vírus conduziram ao sucesso epidemiológico do vírus, responsável por 3 a 5 milhões de casos de doença grave e pela morte de 250.000 a 500.000 pessoas em todo o mundo, anualmente [58].

O período de incubação da influenza é relativamente curto (1-4 dias).

Apesar de todos os grupos etários serem potencialmente infectados pela influenza, as complicações mais extremas ocorrem frequentemente em crianças jovens (<1 ano de idade) e em adultos com idade igual ou superior a 65 anos de idade, especialmente em indivíduos da 3ª idade, cujos estado infeccioso termina com maior frequência, na morte do indivíduo [59]. Esta disposição para complicações é igualmente observada em indivíduos imunocomprometidos, incluindo os portadores de pneumopatias crónicas, de hemoglobinopatias, de neoplasias, de insuficiência renal crónica, de cardiopatia congénita e os diabéticos [60].

Nas regiões temperadas do Hemisfério Norte e Sul, as épocas de gripe surgem sobretudo entre Novembro e Abril e entre Maio e Outubro, respectivamente, enquanto nas regiões equatoriais a epidemiologia da influenza é mais variável ao longo do ano [56].

A natureza explosiva das epidemias e pandemias, e concomitantemente os primeiros sintomas verificados nas comunidades, sugerem que um único indivíduo infectado apresenta um elevado potencial de transmissão do vírus a indivíduos susceptíveis [57].

2.1.9. Patogenia e patologia

Os vírus influenza replicam-se nas células colunares epiteliais do tracto respiratório [61], acedendo às secreções respiratórias e, são subsequentemente emanados, através das partículas de aerossóis libertadas durante os espirros, a tosse e a fala [57]. No entanto, a dispersão da infecção por contacto directo não deve ser menosprezada, sendo aceite, entre a comunidade científica, a transmissão directa do vírus de pessoa a pessoa [57]. As gripes com menor severidade observadas em humanos são caracterizadas por alterações em toda a árvore traqueobrônquica, ou seja, descamação do epitélio ciliado, hiperplasia de células transitórias, edema, hiperemia, congestão e aumento das secreções [12].

A virulência do vírus influenza resulta da interacção entre o patogénio viral e o hospedeiro, dos marcadores de virulência específicos de um ou mais segmentos genómicos do vírus e do nível de protecção imunológica do indivíduo ou da população [62]. As glicoproteínas de superfície, HA e NA, são os alvos da resposta imuno protectora do indivíduo [62].

A clivagem da HA na superfície do vírus é essencial para o carácter infeccioso da influenza, daí que, tanto a susceptibilidade do HA para as proteases celulares como a distribuição destas enzimas nos tecidos do hospedeiro são determinantes na pantropicidade viral [22]. Os mecanismos moleculares que dão origem aos vírus influenza de elevada patogenicidade apesar de estarem bem descritos nas aves, estão mal conhecidos nos humanos [22]. O requisito absoluto para a emergência de uma pandemia é o aparecimento de um novo subtipo HA, embora não se conheça a medida em que o resto do vírus pode ou deve sofrer mutação [61]. De acordo com [41], a hemaglutinina activa é a principal responsável pelo poder patogénico dos vírus influenza e a activação resulta da sua clivagem proteolítica em dois glicopolipeptídeos (HA1 e HA2) pelas proteases do hospedeiro [22]. Recentemente, descobriu-se um novo mecanismo de aquisição de virulência, através da neuraminidase, que sequestra um plasminogénio aumentando a clivagem de HA e a virulência do vírus influenza A pantrópico [22]. Contudo, estas situações isoladamente não são suficientes para explicar a patogenicidade do vírus influenza. Todas as experiências de recombinação realizadas,

asseguram que a patogenicidade não depende de um só gene, mas da combinação dos genes presentes nos oito segmentos genómicos. No entanto, HA e NA têm um papel primordial na infecção [62].

2.1.10. Manifestações clínicas e complicações

O período de incubação do vírus é curto [12], variando de acordo com a quantidade de vírus que intervém na infecção e as defesas imunológicas do indivíduo. A sintomatologia da gripe deste vírus engloba episódios febris, calafrios, cefaleia, tosse seca, dor de garganta, congestão nasal ou coriza, mialgia, anorexia e fadiga [53]. Um sintoma específico da gripe consiste no surgimento abrupto de febre entre os 39 e 40°C. O resfriado é comum e verdadeiros calafrios podem preceder ou acompanhar a febre. A cefaleia pode ser grave acompanhada eventualmente por dor retro-orbitária [12]. A sensação de prostração extrema com mialgia, é experienciada frequentemente sendo particularmente grave nos músculos das costas e nos membros [12]. A tosse - com escassa produção - é frequente e agrava a dor subesternal ou desconforto, acusado por muitos pacientes.

Durante a fase aguda da doença, os sinais físicos manifestam-se através da febre e da infecção da faringe [12], não evidenciando quaisquer anomalias nos pulmões por exame físico ou radiografia. Na ausência de complicações clínicas, a febre diminui em 3 a 4 dias e a recuperação do indivíduo completa-se ao fim de uma semana. Em alguns pacientes, particularmente, nos mais idosos e debilitados, o cansaço fácil e a falta de energia pode persistir durante várias semanas.

No entanto, a sintomatologia da gripe em pacientes com doenças respiratórias crónicas subjacentes, doenças cardiovasculares, metabólicas e renais, e em mulheres no último trimestre de gravidez, poderá ser particularmente grave, caracterizando-se pela deterioração rápida do estado clínico do indivíduo infectado [12], e muitas vezes pelo desenvolvimento de pneumonia viral e bacteriana [53].

Embora a pneumonia primária provocada pela influenza possa ocorrer, a pneumonia resultante da gripe é geralmente despoletada por infecção bacteriana secundária provocada por *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* ou *Streptococcus pyogenes* [12].

2.1.11. Terapia e profilaxia

Devido às epidemias anuais de gripe e perante o risco de novas pandemias, a monitorização epidemiológica do vírus influenza é de fundamental importância [53]. A

rede de vigilância epidemiológica da gripe coordenada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciada em 1947 inclui actualmente cerca de 125 Centros Nacionais de Influenza (CNI) distribuídos por 96 países, juntamente com cinco Centros Colaboradores (CC) da OMS, quatro Laboratórios de Regulação Essencial (LRE) e outros grupos *ad-hoc* [56]. Em conjunto, estes laboratórios processam à volta de 500.000 espécimes respiratórios por ano para monitorização da actividade da influenza em todo o Mundo [56]. Aproximadamente 8000 dos vírus isolados pelos CNI são compartilhados com os CC, possibilitando uma caracterização antigénica e genética mais extensa [56].

Neste âmbito foi criado em Portugal, em 1953, o Centro Nacional da Gripe (CNG), no Instituto de Higiene Dr. Ricardo Jorge. Este Centro tinha por atribuições o estudo da gripe, nomeadamente através do isolamento e caracterização dos vírus influenza e do envio de amostras e informações sobre as estirpes epidémicas aos centros mundiais [2]. O Sistema Nacional de Vigilância da Gripe coordenado pelo Centro Nacional da Gripe (CNG), em colaboração com o Observatório Nacional de Saúde (ONSA) e a Direcção-Geral da Saúde (DGS), garante a vigilância epidemiológica da gripe em Portugal, através da integração da informação epidemiológica/clínica com a virológica. As informações de contexto clínico e laboratorial são fornecidas pela rede de Médicos-Sentinela e pelas Unidades de Urgência de Hospitais e Centros de Saúde [2].

A OMS reúne um comité duas vezes por ano de forma a formalizar a recomendação sobre as estirpes do vírus influenza a serem incluídas na composição da vacina, utilizando para o efeito os dados recolhidos em todo o mundo. A vacina recomendada será administrada e disponibilizada na próxima época gripal [53]. Desde 1977, a recomendação sobre a composição da vacina contra a gripe tem incluído três estirpes virais: duas do tipo A, nomeadamente os subtipos H1N1 e H3N2 e uma do tipo B [53]. O período necessário para implementar o processo de produção da vacina e garantir a entrega atempada da mesma representa a principal condicionante na escolha das estirpes do vírus a serem incluídas na vacina. As recomendações são baseadas na avaliação do potencial impacto do vírus circulante e, em especial, nas variantes antigénicas emergentes, sem o conhecimento do seu significado epidemiológico [56]. Sucintamente, a evidência científica que forma a base para uma recomendação da vacina, inclui não apenas as características antigénicas e genéticas do vírus, mas também a sua prevalência, distribuição geográfica e taxa de propagação. Ao longo dos últimos dez anos, ocorreram catorze alterações às estirpes da vacina recomendada: três na componente H1N1, seis na componente H3N2 e cinco na componente da influenza B [56].

Desde o final dos anos 40, e dado que é praticamente inviável evitar a transmissão do vírus influenza, a vacinação constitui a melhor medida de prevenção para a infecção causada pelo vírus ou para diminuir a sua severidade. As vacinas mais utilizadas mundialmente apresentam duas tipologias distintas, designadamente a vacina de vírus atenuado e a vacina tipo *split*, composta por vírus inactivados pela exposição a detergentes e purificados de forma a conter os antigénios de algumas proteínas do vírus [63].

A vacina do vírus inactivado pode ser administrada em pessoas com idade superior a 6 meses, em mulheres grávidas ou que padeçam de algum problema de saúde crónico. Duas doses podem ser administradas com intervalo de um mês entre cada aplicação, em crianças com idade entre 6 meses e os 8 anos, desde que imunizadas pela primeira vez. Uma única dose é adequada para imunizar os indivíduos adultos saudáveis.

A vacina de vírus atenuado pode ser administrada em pessoas saudáveis com idade compreendida entre os 5 e os 49 anos, com excepção das mulheres grávidas. A vacina é administrada via spray nasal, podendo causar sintomas leves sem levar ao desenvolvimento da doença [64].

Além da vacinação, actualmente, estão disponíveis duas classes de drogas antivirais usadas na prevenção e tratamento contra a actividade da influenza. As adamantinas ou inibidores do canal de iões M2 tais como a amantadina (Symmetrel; Endo Pharmaceuticals, Chads Ford, PA) e a rimantadina (Flumadine; Forest Pharmaceuticals, St Louis, MO). E, os inibidores da neuraminidase, oseltamivir (Tamiflu; Roche Laboratories, Nutley, NJ) e zanamavir (Relenza; GlaxoSmith-Kline, Research Triangle Park, NC) [10,56].

As drogas antivirais (amantadina e rimantadina) são utilizadas apenas nas infecções provocadas pelo vírus influenza A e apresentam certas limitações, nomeadamente o rápido desenvolvimento de resistência viral, o espectro de acção restrito e as reacções adversas no sistema nervoso central e no tracto gastrointestinal [65]. Os novos inibidores de neuraminidase apresentam a vantagem de possuir elevada capacidade para interromper a replicação viral dos vírus influenza A e B e utilidade no tratamento da infecção grave, bem como, potencial para reduzir o risco de complicações [65].

2.1.12. Diagnóstico

A febre acompanhada de manifestações respiratórias e sintomas sistémicos é determinante na distinção entre a influenza e outras infecções respiratórias. Porém, estes

sintomas não são suficientemente específicos para um diagnóstico seguro sem confirmação laboratorial [53]. Uma vez que os sinais e sintomas gripais não são patognomónicos, o diagnóstico clínico dos casos esporádicos de gripe podem ser inviáveis [12]. Até à data, ainda não estão disponíveis as bases clínicas que diferenciem as gripes causadas pelo vírus do tipo A, B ou C [12].

O sucesso na identificação do patogénio influenza – associado a um quadro clínico específico - depende dos procedimentos laboratoriais. Os métodos de diagnósticos existentes apresentam diferenças importantes, no que concerne à sua sensibilidade, especificidade, desempenho, facilidade e duração de execução, custos com equipamentos e consumíveis, e disponibilidade (tabela 3). À excepção da detecção antigénica directa através de testes rápidos, o diagnóstico requer uma capacidade laboratorial sofisticada e a existência de pessoal especializado.

Tabela 3. Principais métodos usados no diagnóstico do vírus influenza [66].

Método	Tempo	Utilidade	Vantagens	Desvantagens
IF	2 – 4	Diagnóstico de rotina	Rapidez	Microscópio de fluorescência
	horas	Vigilância		Não se recupera a estirpe viral
ELISA	0,25 – 2	Diagnóstico de rotina	Rapidez	Custo
	horas	Diagnóstico rápido	Laboratório básico Pouca dificuldade	Não se recupera a estirpe viral
Cultivo celular	2 – 7	Vigilância	Temos vírus completo	Laboratório e pessoal especializado
	dias		Baixo custo	Demora
RT-PCR	1 – 2	Vigilância	Alta sensibilidade	Custo
	dias			Laboratório e pessoal especializado
				Demora Não se recupera a estirpe viral

Diversas metodologias de identificação da influenza (figura 7) estão disponíveis, nomeadamente as técnicas de caracterização genética e antigénica, os testes de ELISA, a RT-PCR, a cultura viral ou ovos embrionados (método padrão), a imunofluorescência indirecta (IF) e os TRDIs (Testes Rápidos para Diagnóstico da Influenza) [66]. A caracterização genética e antigénica do vírus é realizada pelo teste de inibição da hemaglutinação (IH) e pelas técnicas de biologia molecular, respectivamente.

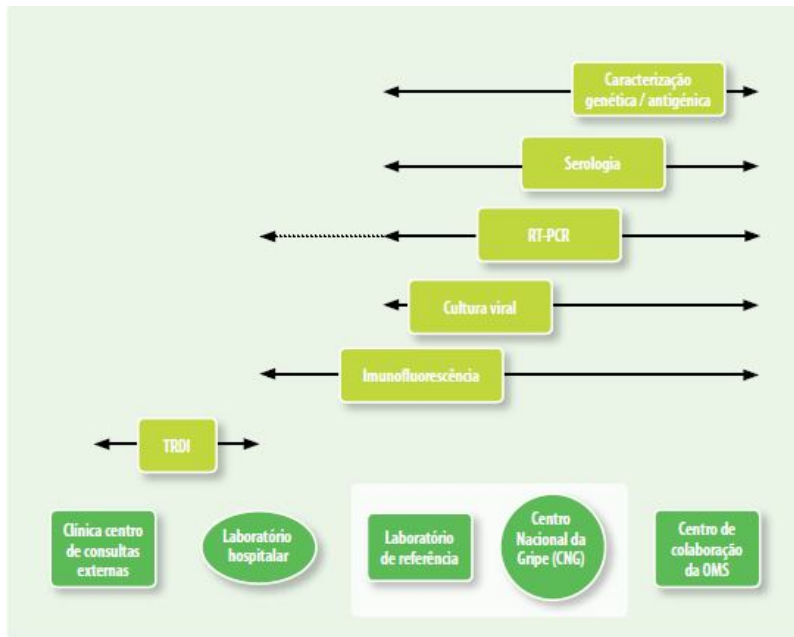


Figura 7. Exames de diagnóstico disponíveis em diferentes ambientes laboratoriais [66].

Neste trabalho entre a diversidade de técnicas possíveis de serem utilizadas no diagnóstico de infecção respiratória foram usadas o ensaio imunoenzimático indirecto (*ELISA*) para detecção da infecção pela influenza A e/ou B e a técnica de PCR, reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (*RT-PCR*) para a detecção do vírus pandémico (H1N1) 2009.

2.1.12.1. Ensaio imunoenzimático indirecto (*ELISA*)

O ensaio imunoenzimático (*ELISA*) é uma técnica bioquímica usada principalmente na detecção serológica de anticorpos ou antígenos na amostra. Esta metodologia utiliza dois anticorpos, um deles específico do antígeno e o outro acoplado a um enzima. Este segundo anticorpo dá o nome ao ensaio “ligado à enzima” e forma o substrato cromogénico ou fluorogénico que produzirá um sinal. A técnica é uma ferramenta útil tanto na determinação das concentrações do anticorpo no soro, como na detecção da presença do antígeno. O *ELISA* pode ser realizado para detectar tanto a presença do antígeno como do anticorpo na amostra. O kit Influenza A/B IgG/IgM *ELISA*® da Genzyme Virotech® usado no presente estudo constitui um ensaio imunoenzimático rápido e *in vitro*, destinado à detecção diferencial quantitativa e qualitativa de anticorpos humanos contra os vírus influenza A e B no soro.

2.1.12.1.1. Princípio do teste

O teste ELISA indirecto (figura 8) baseia-se na interacção anticorpo-antigénio detectável pela reacção enzimática. Na reacção, os antigénios purificados estão adsorvidos na superfície interna de cada poço das microplacas (processo conhecido como sensibilização).

Durante a incubação inicial, os anticorpos específicos existentes na amostra do doente ligam-se a estes antigénios imobilizados na fase sólida formando um imunocomplexo e permanecem retidos após a primeira lavagem. As imunoglobulinas não ligadas são removidas com PBS-Tween 20, solução utilizada nos processos de lavagem. Posteriormente, um segundo anticorpo conjugado com a enzima peroxidase liga-se aos anticorpos do doente presentes na placa após a primeira incubação. As imunoglobulinas não ligadas são novamente removidas por processos de lavagem com PBS-Tween 20.

A reacção serológica é visualizada, adicionado substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina) que produz uma substância corada azul na presença da peroxidase. Esta substância após a adição da solução stop muda para amarelo. A coloração amarela é quantificada após o bloqueio da reacção enzimática. A intensidade desta coloração é proporcional à concentração de anticorpos específicos existentes na amostra. Esta metodologia apresenta elevada sensibilidade e especificidade.



Figura 8. Reacção relativa ao ensaio imunoenzimático indirecto (ELISA) [67].

2.1.12.1.2. Avaliação do teste

Na validação do teste usam-se controlos, que permitem a determinação semiquantitativa de anticorpos IgG e IgM específicos, cuja concentração é calculada em unidades Virotech (VE). Variações em resultado do modo de realização do teste são compensadas pelo método de cálculo, sendo conseguida uma elevada reprodutibilidade.

As amostras são consideradas positivas se os valores de absorvância forem superiores a 10% do *cut-off*. As amostras são negativas para valores de absorvância inferiores a 10% do *cut-off*. As amostras com um valor de absorvância inferior a 10% acima ou abaixo do *cut-off* foram consideradas duvidosas.

i) Controlo de função do teste:

a) Valores de OD (densidade óptica, do inglês *optical density*)

O valor OD do branco deve ser <0,15. Os valores de OD dos controlos negativos devem situar-se abaixo dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade. Os valores de OD dos controlos positivos e dos *cut-off* devem situar-se acima dos valores de OD indicados no certificado de controlo de qualidade (tabela 4).

b) Unidades Virotech (VE)

As unidades Virotech (VE) são unidades arbitrárias usadas na medição da concentração de anticorpos mediante a técnica de ELISA utilizando o kit Influenza A/B IgG/IgM ELISA® da Genzyme Virotech®. As unidades Virotech (VE) dos controlos *cut-off* são definidas como 10 VE. As VE calculadas dos controlos positivos devem situar-se dentro das gamas indicadas no certificado de controlo de qualidade (tabela 4). Se os requisitos (valores de OD e VE) não forem preenchidos, o teste deve ser repetido.

Tabela 4. Certificado de controlo de qualidade do kit Influenza A/B IgG/IgM ELISA® da Genzyme Virotech®.

	IgG			IgM		
	NEG	CO	POS	NEG	CO	POS
	-	+/-	+	-	+/-	+
OD 450/620 nm	< 0,15	> 0,25	> 0,46	< 0,15	> 0,33	> 0,68
VE	< 9	10	> 11	< 9	10	> 11

ii) Cálculo das unidades Virotech (VE)

As unidades Virotech são calculadas a partir das densidades ópticas médias da amostra e do cut-off. O cálculo das VE deve ser realizado através das fórmulas (figura 9). A extinção do valor zero (450/620 nm) deve ser subtraída de todos os coeficientes de extinção.

$$VE \text{ (controlo positivo)} = \frac{OD \text{ (controlo positivo)}}{OD \text{ (controlo cut-off)}} \times 10$$

$$VE \text{ (soro do paciente)} = \frac{OD \text{ (soro do paciente)}}{OD \text{ (controlo cut-off)}} \times 10$$

Figura 9. Cálculo das unidades Virotech (VE).

Na determinação dos anticorpos IgM podem obter-se muitas vezes, resultados que são falsos positivos devido à presença do factor reumatóide (RF) e/ou de anticorpos IgG específicos do microrganismo na amostra. Por conseguinte, o factor reumatóide, basicamente o anticorpo IgM, compete com os anticorpos IgG pelos mesmos sítios de ligação ao antigénio, produzindo falsos positivos quando o conjugado IgM é adicionado. Por outro lado, o excesso de IgG pode promover competição entre diferentes tipos de imunoglobulinas, dando lugar a falsos negativos. Por esta razão, é necessário submeter as amostras dos pacientes para a detecção das IgM a um pré-tratamento com adsorvente. Este pré-tratamento produz a imunoprecipitação das IgG evitando deste modo, ambos os tipos de interferências.

O adsorvente VIR-ELISA IgG – RF - SORBENT® (Viro-Immun Labor-Diagnostika GmbH, Alemanha) é utilizado no pré-tratamento das amostras dos pacientes. Ao fazer isto, os anticorpos IgG específicos do agente patogénico são removidos, assim como os IgM-RF possivelmente existentes.

2.1.12.2. Reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

A detecção molecular do vírus influenza é realizada por PCR em tempo real, precedida de transcrição reversa. Esta reacção possui como molde inicial a molécula de RNA e gera cDNA, a partir dos desoxirribonucleotídeos trifostatados. Após a obtenção do cDNA, uma alíquota desta amostra de cDNA é utilizada na reacção de amplificação por PCR. A reacção de amplificação em tempo real, uma variante da reacção de PCR convencional, representa um grande avanço nos métodos moleculares de auxílio ao diagnóstico, particularmente por facilitar as tarefas de quantificação da expressão génica em determinado tecido ou amostra biológica.

2.1.12.2.1. Princípio do teste

O método baseia-se na detecção de fluorescência, uma vez que utiliza um corante fluorescente ou sonda marcada capaz de detectar a luz oriunda da reacção de amplificação. A utilização de sondas fluorescentes específicas para uma região do DNA-alvo possibilita, através da detecção com um software informático, a visualização do aumento da quantidade de DNA em tempo real. Estas sondas consistem em oligonucleótidos com modificações nas duas extremidades, nomeadamente, um

fluoróculo *reporter* que emite radiação (extremidade 5') e um fluoróculo *quencher* (extremidade 3') que absorve a luz que o primeiro emite, impedindo a sua detecção.

Dessa forma, o sistema óptico do equipamento não é capaz de detectar a fluorescência no tubo de reacção. Por outro lado, se a reacção for capaz de gerar produtos, a sonda irá hibridizar-se com esse alvo gerado e ficará exposta à actividade exonucleotídica da polimerase. Como consequência, essa sonda será degradada e o fluoróculo ficará distante do *quencher* que não será capaz de absorver a luz emitida permitindo a detecção da fluorescência. A fluorescência eventualmente produzida pela amostra é detectada pelo sistema e o ciclo da reacção de PCR em que a fluorescência da amostra é detectada inequivocamente acima do ruído de fundo (*background*) é denominado de Ct ou CP (*cycle threshold* ou *crossing point*). Assim, a cada estímulo luminoso gerado pelo equipamento corresponderá uma segunda emissão de luz pelo fluoróculo. Portanto, a emissão de luz será proporcional à quantidade de produto gerado no tubo de reacção, que por sua vez, proporcional à quantidade inicial de alvos da reacção de amplificação.

O teste laboratorial recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a detecção qualitativa da infecção pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009 [68], conhecido como vírus da gripe suína, é realizado pela técnica da reacção em cadeia da polimerase de retrotranscrição em tempo real (RT-PCR), de acordo com o protocolo estabelecido pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Este teste é multiprimer, pois inclui a utilização de um conjunto de oligonucleotídeos (*primers*) e sondas marcadas (*probes*) para detecção do vírus da gripe suína, através da amplificação de fragmentos de genes específicos. O protocolo do CDC preconiza a realização de quatro reacções de amplificação separadas na mesma placa:

- i) Reacção **InfA** - detecta do gene M do vírus influenza A universal
- ii) Reacção **swInfA** - detecta o gene NP de todos os vírus Influenza A de origem suína
- iii) Reacção **swH1** - detecta o gene HA específico para o vírus A/H1N1 pandémico
- iv) Reacção **RNase P** – detecta o gene da RNase P humana e serve como controlo interno da reacção para indicar uma extracção adequada do ácido nucleico da amostra clínica.

Em cada uma destas quatro reacções, é empregue um par de iniciadores senso e antisenso (*primers forward e reverse*) e uma sonda marcada com fluoróchromos. Este conjunto de *primers* e sondas usados na detecção da influenza A (H1N1) contém 12 sequências (tabela 5), e estão de acordo com o protocolo estabelecido pela OMS intitulado "*CDC protocol of realtime RTPCR for swine influenza A (H1N1)*" [68].

Tabela 5. Conjunto de *primers* e sonda usados na tipagem e subtipagem do vírus influenza A.

Nome dos <i>primers</i> e sonda	Sequência (5' → 3')
InfA Forward	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
InfA Reverse	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA
InfA Probe 1	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
SW InfA Forward	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG
SW InfA Reverse	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC
SW InfA Probe 2	CYA CTG CAA GCC CA" T" ACA CAC AAG CAG GCA
SW H1 Forward	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA
SW H1 Reverse	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC
SW H1 Probe 2	CA GAA TAT ACA "T"CC RGT CAC AAT TGG ARA A
RnaseP Forward	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G
RnaseP Reverse	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT
RnaseP Probe 1	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG

1 As sondas TaqMan® são marcadas com dois fluoróchromos diferentes, um na extremidade 5', o "reporter" (6-carboxifluoresceína- FAM) e outro na extremidade 3', o "quencher", Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA).

2 As sondas TaqMan® são marcadas na extremidade 5' com o fluoróchromo "repórter" (6-carboxifluoresceína- FAM) e *quenched* internamente a um resíduo "T" modificado com BHQ1, com uma extremidade 3' modificada para prevenir a extensão da sonda pela Taq polimerase.

2.2. Aprovação pela comissão de ética

A realização do projecto "O estudo da prevalência do vírus influenza A e B numa amostragem populacional do Arquipélago da Madeira" no período compreendido entre Abril de 2009 e Abril de 2011 teve a aprovação do Conselho de Administração do SESARAM, E.P.E. após parecer favorável da Comissão de Ética para a Saúde (CES) do Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira, E.P.E (SESARAM, E.P.E.).

3. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1. Amostragem

O presente estudo foi desenvolvido no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, Serviço de Saúde da Região Autónoma da Madeira E.P.E. (SESARAM, E.P.E.). O organismo que presta serviços primários e diferenciados na área da saúde às populações da Madeira.

O Serviço de Patologia Clínica tem por missão assegurar a realização dos exames e análises clínicas necessárias ao diagnóstico e terapêutica dos utentes dos Serviços de Internamento, Urgências, Consultas Externas e 54 Centros de Saúde Locais e Concelhios.

Este estudo incidiu sobre todos os utentes provenientes destes serviços, no período compreendido entre 1 de Abril de 2009 a 30 de Abril de 2011, para os quais foi solicitado provas de serologia viral para pesquisa de anticorpos anti-influenza A e anti-influenza B. Relativamente à detecção da infecção provocada pela gripe A (H1N1) 2009, foram estudados apenas os utentes que preenchiam a definição de caso suspeito de gripe A.

3.1.1. Identificação das amostras

Os utentes dos Serviços de Internamento, Urgências e Consulta Externa do Hospital Dr. Nélio Mendonça e dos Centros de Saúde foram registados no sistema informático do laboratório através da abertura de uma ficha, e posterior atribuição de um número de identificação.

3.1.2. Colheita das amostras

3.1.2.1. Detecção da infecção provocada pelo vírus influenza A e influenza B

As amostras de sangue foram colhidas pelos serviços, à excepção dos utentes da Consulta Externa, aos quais a colheita foi feita no laboratório.

O sangue foi recolhido, garrotando-se o braço e escolhendo-se a veia mais proeminente da fossa cubital (mediana, basílica ou cefálica). Antes da punção avaliou-se a orientação do vaso pela visualização ou pela palpação. A assepsia do local da colheita fez-se com antiséptico Skin Prep® (Vycon®) e utilizou-se um sistema de vácuo para recolher o sangue para os tubos.

Na obtenção do soro utilizaram-se tubos BD Vacutainer® SS II Advance® para a colheita das amostras, de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), desenvolvido segundo as melhores práticas em ensaios clínicos e laboratoriais. Estes tubos contêm um activador de coágulo adsorvido na parede do tubo, que acelera o processo de coagulação e um gel-separador no fundo do tubo para a obtenção do soro sanguíneo, proporcionando uma maior eficiência em todo o processo laboratorial [69].

Uma vez colhido aproximadamente 5,0 mL de sangue, retirou-se a agulha e o adaptador e comprimiu-se o sítio puncionado com algodão embebido em álcool. Após a triagem e respectiva etiquetagem dos tubos de colheita, as amostras são encaminhadas para o aparelho AutoMate® 800 (Beckman Coulter Inc., USA). A utilização deste processador de amostras permite, que os tubos usados na obtenção de soro sejam centrifugados a 3000 r.p.m, durante 8 minutos e a sua aliquotagem seja processada automaticamente.

As amostras colhidas fora do Serviço de Patologia Clínica foram transportadas para o laboratório em caixas refrigeradas (temperatura entre os 5°C e os 12°C). A identificação processou-se de forma idêntica à já descrita.

3.1.2.2. Detecção da infecção provocada pela gripe A (H1N1) 2009

As amostras dos indivíduos suspeitos de gripe A foram colhidas de preferência nos 3 primeiros dias após o início dos sintomas clínicos.

Após rastreio médico, os indivíduos foram encaminhados para a colheita de zaragoas da orofaringe ou nasofaringe e a ficha de investigação clínico-virológica preenchida. Todas as amostras foram acompanhadas pelo formulário Gripe OT- 4.1, bem como a requisição de exames laboratoriais de pesquisa do vírus da gripe A (H1N1) ou dos vírus da gripe sazonal.

Os produtos biológicos para o diagnóstico laboratorial foram colhidos em recipientes apropriados de acordo com a sua natureza e identificados com o nome do paciente e data da colheita. Deste modo foram usados recipientes colectores de muco em plástico, esterilizado e zaragoas estéreis (meio de transporte adequado à preservação de vírus). Zaragoas com haste de madeira não devem ser utilizadas, pois podem conter inibidores ou substâncias que destroem as partículas virais.

As amostras para teste laboratorial foram colhidas de acordo com a seguinte ordem de prioridade: 1º) *Tracto respiratório superior*: é aconselhável o envio de duas amostras: exsudado (ou aspirado) nasofaríngeo e exsudado da orofaringe. Caso não seja possível deve ser colhido exsudado nasal; 2º) *Tracto respiratório inferior*: no caso de doentes entubados ou submetidos a broncoscopia - aspirado endotraqueal e/ou lavado brônquico e/ou lavado bronco-alveolar [70].

Após a colheita e acondicionamento das amostras, estas foram encaminhadas de imediato ao laboratório, segundo as recomendações gerais descritas nos documentos actualizados da OMS, "*Guidance on Regulation for Transport of Infectious Substances*" para identificação e isolamento do vírus [71].

3.2. Métodos

3.2.1. Teste ELISA

O kit Influenza A/B IgG/IgM ELISA® da Genzyme Virotech® foi usado no ensaio imunoenzimático rápido e *in vitro*, destinado à detecção diferencial quantitativa e qualitativa de anticorpos humanos contra os vírus influenza A e B presentes no soro (ver Anexos, tabela 25).

Na detecção do vírus influenza A foi utilizado como antigénio uma mistura das estirpes A/Brisbane/59/2007 (H1N1) e A/ Brisbane /10/2007 (H3N2), enquanto no influenza B foi usada a estirpe B/Brisbane/60/2008. Estes antigénios dos vírus sazonais influenza A e B correspondem às recomendações da OMS no Hemisfério Norte para 2009/2010. A partir do lote de placas 213 e 103, as placas ELISA Virotech® estão revestidas com um antigénio actualizado. Trata-se da estirpe do vírus A/California/7/2009 (H1N1) e A/Perth/16/2009 (H3N2), que de acordo com a recomendação da OMS deve ser incluído nas vacinas para a campanha de 2010/2011 [72].

Antes do início do teste no processador automático, diluiu-se 10 µL da amostra do paciente em 500 µL de tampão de diluição PBS-Tween 20 (ver Anexos, tabela 25).

Procedeu-se a uma nova diluição, desta vez, com a solução de tratamento VIR-ELISA IgG – RF - SORBENT® e a amostra de soro pré-diluída na proporção de 1:1.

Deixou-se incubar a mistura durante 30 minutos antes de colocar no analisador automático para microplacas AP22 Speedy® da DAS®.

Nas amostras para a determinação das IgG, a diluição prévia com solução de tratamento não é necessária.

Nos testes Influenza A/B IgM/IgG ELISA® da Genzyme Virotech®, pipetou-se 100 µL do controlo negativo, do controlo cut-off e do controlo positivo (*ver Anexos, tabela 25*) nos poços revestidos com antígeno como ilustra a figura 10.

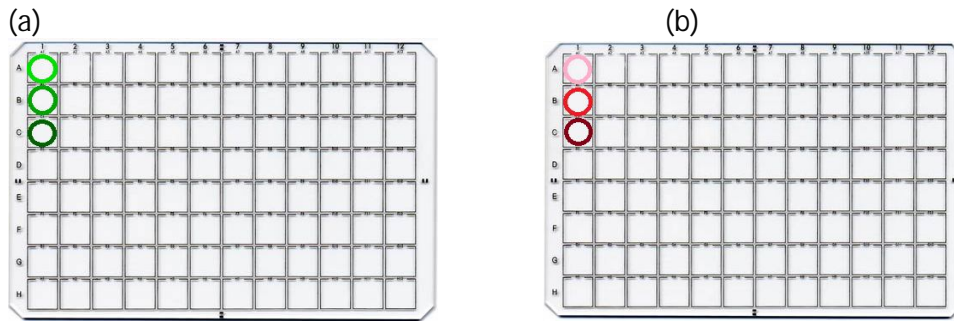


Figura 10. Microplacas revestidas com antígeno usadas no teste ELISA (a) na detecção dos anticorpos IgG (os círculos verde claro, verde e verde escuro correspondem, ao controlo negativo, controlo cut-off e controlo positivo, respectivamente); (b) na detecção dos anticorpos IgM (os círculos bordeaux, vermelho e rosa correspondem, ao controlo negativo, controlo cut-off, e controlo positivo, respectivamente).

Após a pipetagem dos controlos, as microplacas foram colocadas na superfície de trabalho dos respectivos processadores AP22 SPEEDY para o teste ELISA, cada um para a detecção correspondente aos anticorpos IgG e IgM.

Preparou-se a restante superfície de trabalho, conforme ilustrado na figura 11, adicionando os reagentes (conjugado, substrato e solução stop) (*ver Anexos, tabela 25*) aos “tabuleiros específicos para reagentes, calibradores e controlos” e o tampão de diluição ao “tabuleiro comum ELISA”.

Finalmente, para a detecção das IgG, foram colocadas as amostras não diluídas dos doentes no “tabuleiro porta-amostras”, assim como os tubos de ensaio no “tabuleiro de pré-diluição”.

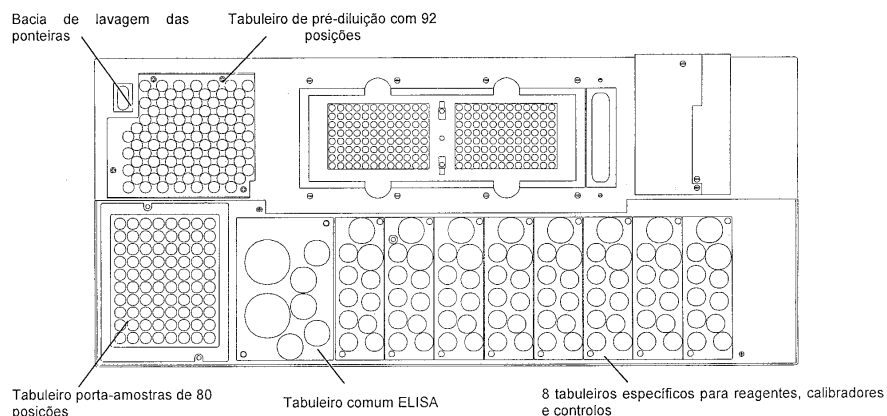


Figura 11. Superfície de trabalho do processador AP22 SPEEDY para o teste ELISA.

No outro processador responsável pela detecção dos IgM, as amostras diluídas são colocadas directamente no “tabuleiro porta-amostras”, uma vez que a diluição já foi realizada.

Uma vez preparados ambos os analisadores, deu-se início à execução da sessão de trabalho.

Pipetou-se 100 μ L das amostras diluídas directamente para os poços revestidos com antigénio das microplacas. Depois da pipetagem, as amostras ficaram a incubar durante 30 minutos, a 37°C.

Findo o período de incubação, lavou-se os poços 4 vezes, cada uma com 400 μ L de solução de lavagem por poço.

Adicionou-se 100 μ L de conjugado (ver Anexos, tabela 25) por poço e deixou-se a incubar por 30 minutos, a 37°C. Terminou-se a incubação do conjugado com 4 lavagens.

De seguida, foram pipetados 100 μ L do substrato TMB (ver Anexos, tabela 25) e deixou-se incubar durante 30 minutos, a 37°C, tendo o cuidado de manter a tampa fechada de modo a facultar um espaço escuro.

Parou-se a reacção do substrato, pipetando 50 μ L da solução stop de citrato (ver Anexos, tabela 25) em todos os poços, sendo visível uma cor amarela homogénea.

Mediu-se os coeficientes de extinção da mistura reagente nos 450 e 620 nm. A medição espectrofotométrica deve ser realizada no prazo máximo de uma hora após a adição da solução stop.

O analisador automático de microplacas AP22 SPEEDY® é um instrumento destinado à distribuição, lavagem e leitura de microplacas em análises imunoenzimáticas. É capaz de processar amostras biológicas (diluindo-as previamente, se necessário) com

reagentes específicos e de processar até 2 microplacas em linha. O fluxograma da metodologia utilizada no processamento das amostras no processador AP22 SPEEDY, durante o teste ELISA pode ser consultado nos Anexos, tabela 26.

3.2.2. Execução da RT-PCR

O diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009 foi efectuado com o kit de extracção comercial, **QIAamp Viral RNA Mini Kit** (QIAGEN®, Alemanha) (ver Anexos, tabela 27). De acordo com este protocolo, preparou-se os reagentes necessários à realização do teste, como indica a tabela 6.

Tabela 6. Preparação dos reagentes.

Reagente	Preparação
<i>Solução AVL</i>	Adicionou-se 1 mL de tampão AVE ao tubo contendo RNA <i>carrier</i> liofilizado. Dissolveu-se por agitação no vórtex e transferiu-se o conteúdo para o frasco de tampão AVL. Homogeneizou-se no vórtex e fizeram-se alíquotas de 560 µL.
<i>Tampão AW1</i>	Adicionou-se 25 mL de etanol (96%) ao frasco contendo 19 mL de tampão AW1 concentrado.
<i>Tampão AW2</i>	Adicionou-se 30 mL de etanol (96%) ao frasco contendo 13 mL de tampão AW2 concentrado.

3.2.2.1. Tratamento das amostras

A proteólise das amostras é realizada em condições altamente desnaturantes a temperaturas elevadas e inclui a sua lise na presença do tampão de eluição *Buffer AVE* (QIAGEN®) e da proteinase K (QIAGEN®), os quais juntamente, asseguram a digestão das proteínas contaminantes presentes e a inactivação de nucleases.

Este procedimento destina-se ao pré-tratamento de amostras respiratórias viscosas antes da purificação de ácidos nucleicos. As amostras respiratórias não viscosas não exigem qualquer pré-tratamento, podendo ser usadas imediatamente como material de partida para o protocolo de purificação.

No tratamento das amostras viscosas, pipetou-se 40 µL de proteinase K e 400 µL da amostra do paciente para um tubo *ependorf*.

Deixou-se incubar durante 1 hora a 56°C no banho de água para tornar a amostra fluída.

3.2.2.2. Extração em coluna do RNA viral

Inicialmente, adicionou-se 140 μL de amostra (tratada ou não, consoante a viscosidade) a 560 μL da solução AVL-RNA carrier, homogeneizou-se no vórtex durante 15 segundos (ver Anexos, tabela 26).

Colocou-se 10 minutos à temperatura ambiente para promover a lise, inactivando as RNAses e assegurando o isolamento do RNA viral intacto.

Seguidamente foi realizada uma breve centrifugação caso o tubo apresente dispersão de gotas. Foram adicionados 560 μL de etanol (96%) à amostra, agitou-se e centrifugou-se durante 15 segundos.

Aplicou-se 630 μL da mistura num tubo "QIAamp Spin Column" (colunas de extracção) inserido num tubo colector, como ilustrado na figura 12. Centrifugou-se a 8000 r.p.m., durante 1 minuto, para obter a ligação do RNA à coluna, tendo-se descartado o tubo colector contendo o filtrado e colocou-se a coluna num novo tubo colector.

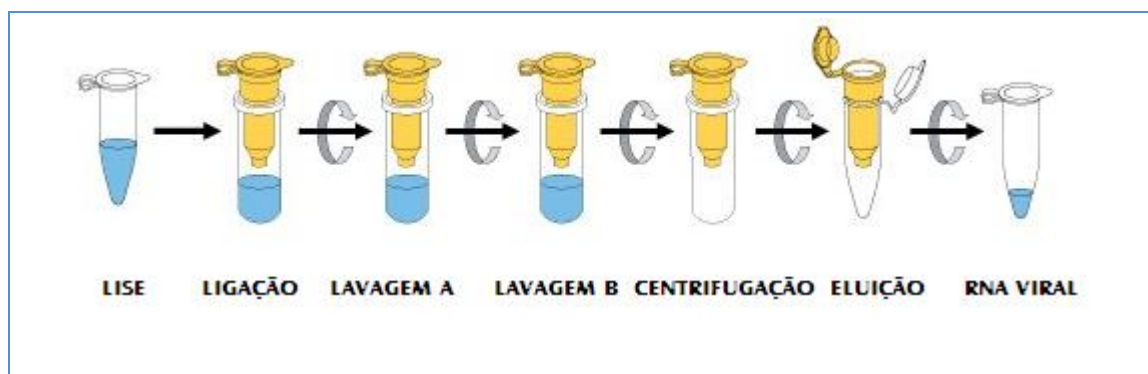


Figura 12. Procedimento de extracção de RNA viral utilizando uma coluna e o QIAamp Viral RNA Mini Kit® (QIAGEN) [73].

O RNA viral ligado à coluna é lavado em dois passos de centrifugação curta para eliminar contaminantes. O uso de dois tampões de lavagem diferentes, *AW1* e *AW2*, (ver Anexos, tabela 27) melhora significativamente a pureza do RNA eluído. As condições de lavagem optimizadas asseguram a completa remoção dos contaminantes residuais sem afectar o RNA ligado.

Adicionou-se 500 μL de Tampão *AW1* (tampão de lavagem - lavagem A), centrifugou-se a 8000 r.p.m., durante 1 minuto. Descartou-se o tubo colector com o filtrado e colocou-se a coluna num tubo colector novo.

Adicionou-se à coluna 500 µL de Tampão AW2 (tampão de lavagem – lavagem B), centrifugou-se a 8000 r.p.m., durante 1 minuto. Descartou-se o tubo colector com o filtrado e colocou-se a coluna num novo tubo colector.

Por fim, para eluir o RNA, colocou-se a coluna “*QIAamp Spin Column*” num tubo colector novo e adicionou-se 60 µL de tampão AVE (ver Anexos, tabela 27), tendo-se deixado incubar durante 1 minuto à temperatura ambiente (para eluir o RNA da coluna para o tubo colector). O tampão AVE é água livre de RNases que contém azida sódica 0,04% para evitar o crescimento microbiano e posterior contaminação com RNases.

Finalmente, centrifugou-se a suspensão a 8000 r.p.m., por 1 minuto, recolheu-se o eluído com o RNA extraído e descartou-se a coluna de extracção. No caso da amplificação do RNA extraído não ser imediata, este foi guardado a -80°C.

3.2.2.3. RT-PCR

O teste laboratorial recomendado pela OMS para a detecção qualitativa da infecção pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009 é a reacção em cadeia da polimerase de retrotranscrição em tempo real (RT-PCR).

A realização deste método foi efectuada utilizando o kit comercial, AgPath-ID® One Step RT-PCR (Applied Biosystems, USA) (ver Anexos, tabela 28), segundo o seguinte procedimento:

Marcou-se os tubos de microcentrífuga (1,5 mL) para cada teste (**infA**, **swInfA**, **swH1 e RNase P**). Determinou-se o número de reacções (N) a configurar para cada ensaio. Se o número de amostras (n) incluindo os controlos, varia entre 1 e 14, então $N = n + 1$; se o número de amostras (n) incluindo os controlos, for superior a 15, $N = n + 2$. Os valores aqui apresentados correspondem ao diagnóstico laboratorial para uma amostra (n=1).

Pipetou-se para cada um dos tubos de microcentrífuga identificado, 24 µL de água livre de nucleases, 50 µL de Master Mix e 4 µL de Enzyme Mix (ver Anexos, tabela 28), como ilustrado na figura 13.

Para cada um destes tubos, juntou-se 2 µL do conjunto de *primer*/sonda (ver Anexos, tabela 28) correspondente.

Centrifugou-se durante 5 segundos para colectar o conteúdo no fundo do tubo e preparou-se a microplaca de 96 poços.

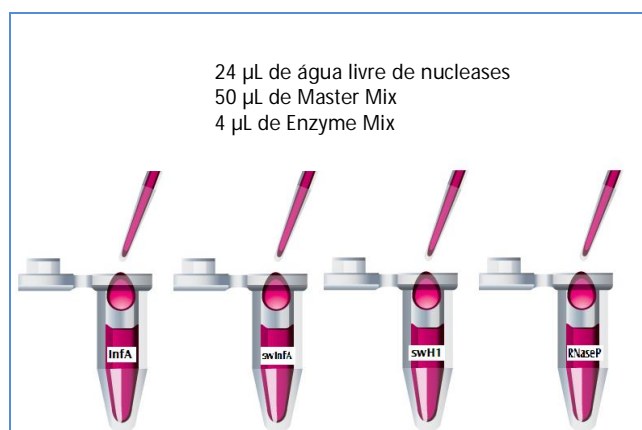


Figura 13. Preparação das misturas reagentes.

Dispensou-se 20 µL de cada mistura reagente para os poços da microplaca representada na tabela 7.

Tabela 7. Composição da microplaca com adição das misturas reagentes referentes a cada teste.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	InfA	swInfA	swH1	RNaseP								
B	InfA	swInfA	swH1	RNaseP								
C	InfA	swInfA	swH1	RNaseP								
D												
E												
F												
G												
H												

Nos poços dos controlos negativos, pipetou-se 5 µL de água livre de nucleases e nos poços dos controlos positivos, 5 µL do controlo positivo, tendo o cuidado de mudar de ponta a cada adição.

Agitou-se no vórtex os tubos contendo a amostra com o RNA extraído anteriormente por 5 segundos e centrifugou-se por mais 5 segundos.

Pipetou-se 5 µL da amostra em todos os poços relativos a esta. O esquema da distribuição dos controlos e amostras está ilustrado na tabela 8.

Tabela 8. Composição da microplaca para a detecção do vírus da gripe A (H1N1)v 2009.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Controlo -	Controlo -	Controlo -	Controlo -								
B	Controlo +	Controlo +	Controlo +	Controlo +								
C	Amostra	Amostra	Amostra	Amostra								
D												
E												
F												
G												
H												

Antes de inserir a microplaca no aparelho, programou-se no instrumento ABI Prism 7300® (Applied Biosystems®, USA) os parâmetros do ciclo térmico indicando 45 ciclos e um volume total de reacção de 25 µL cujas condições estão enunciadas na tabela 9.

Tabela 9. Programação da sessão de trabalho no termociclador ABI Prism 7300® (Applied Biosystems).

	ABI Prism 7300®	
	Temperatura	Tempo
Transcrição reversa	50°C	30 min.
Inibidor de activação Taq	95°C	2 min.
Amplificação PCR	95°C	15 seg.
	55°C	30 seg.

3.3. Análise estatística e exploratória dos dados

Recorreu-se ao sistema informático do laboratório para seleccionar todos os utentes que realizaram exames serológicos virais para pesquisa de anticorpos anti-influenza A e anti-influenza B. Fez-se o levantamento retrospectivo das concentrações de anticorpos IgG e IgM contra o vírus influenza A e B.

O levantamento dos dados obtidos foi organizado em tabelas em função dos parâmetros a analisar com recurso ao *software* Microsoft Excel 2007. O tratamento de dados deste estudo baseou-se na estatística descritiva para cada parâmetro e as variáveis foram sumarizadas em medianas, desvios-padrão e variação de quartil. Para as variáveis categóricas, a percentagem de doentes em cada categoria foi calculada.

O programa SPSS 18.0 (*Statistical Package for Social Sciences*) foi utilizado na realização da análise estatística profunda dos dados obtidos, com a comparação de médias, os testes de independência e os cálculos de correlações.

Aplicou-se o teste de independência do Qui-quadrado para testar a hipótese de existir associação entre o género (masculino ou feminino) e infecção por IAV ou IBV.

Aplicou-se a correlação de Pearson para testar a hipótese de existir associação entre o grupo etário e infecção por IAV ou IBV.

Determinou-se o *odd ratio* para determinar o risco associado.

O teste não-paramétrico aplicado foi o Mann-Whitney.

Aplicou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para testar a normalidade das variáveis.

4. ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

No presente capítulo são apresentados os resultados obtidos no estudo serológico dos anticorpos anti-influenza A e anti-influenza B estudados numa amostragem da população do Arquipélago da Madeira, assim como os resultados relacionados com as infeções provocadas pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009.

Os resultados são agrupados considerando as duas metodologias de detecção de infeção pelo vírus influenza, de forma a facilitar a sua interpretação e posterior discussão.

4.1. Detecção da infeção pelo vírus influenza A e influenza B

Este estudo tem por base a análise de todos os indivíduos utentes do Laboratório de Patologia Clínica, aos quais foram solicitadas as provas de serologia viral, durante o período compreendido entre 1 de Abril de 2009 e 30 de Abril de 2011. Deste modo, a amostragem analisada na Secção de Serologia foi constituída por 981 amostras de soro, das quais 339 foram avaliadas em 2009, 538 em 2010 e as restantes 104 em 2011.

A determinação quantitativa dos anticorpos IgG e IgM específicos foi realizada em unidades Virotech (VE).

Segundo revela a tabela 10, as amostras foram consideradas positivas quando a concentração de anticorpos IgG e/ou IgM no soro é superior a 1,1 VE, negativas quando os níveis correspondem a valores inferiores a 0,9 VE e as amostras com valores compreendidos entre 0,9 VE e 1,1 VE foram consideradas duvidosas.

Tabela 10. Algoritmo para o diagnóstico serológico de avaliação dos anticorpos IgG e IgM anti-influenza A e B em soros de pacientes.

Unidades Virotech	Avaliação	Interpretação
< 0,9	Negativa	Anticorpos sem concentração significativa
0,9 – 1,1	Borderline	Concentração de anticorpos sem aumento significativo. Repetir teste, eventualmente pedir 2ª amostra de soro.
> 1,1	Positiva	Concentração de anticorpos com aumento significativo: <ul style="list-style-type: none"> • Indício de infeção recente • Indício de infeção sofrida • Anticorpos produzidos por vacinas

A estatística descritiva e tabelas foram utilizadas, com a finalidade de organizar e analisar os dados, utilizando gráficos e tabelas como forma de ilustrar os resultados. A caixa-de-bigodes é um modo gráfico que permite facilmente interpretar a dispersão dos dados. Neste caso, pretende-se comparar a variação de IgG e IgM no universo de amostras organizadas de acordo com a tabela 10. O recurso a caixas-de-bigodes paralelas é uma ferramenta muito útil, pois permite de forma fácil fazer a comparação dos conjuntos de dados. Nesse sentido, elaborou-se uma caixa-de-bigodes, representada pela figura 14 e 15 do grupo de indivíduos com concentrações de anticorpos IgG e IgM positivas, negativas e duvidosas para o vírus influenza A (IAV) e B (IBV). As caixas-de-bigodes demonstram a existência de um grande número de *outliers* entre as concentrações negativas ao contrário das concentrações positivas.

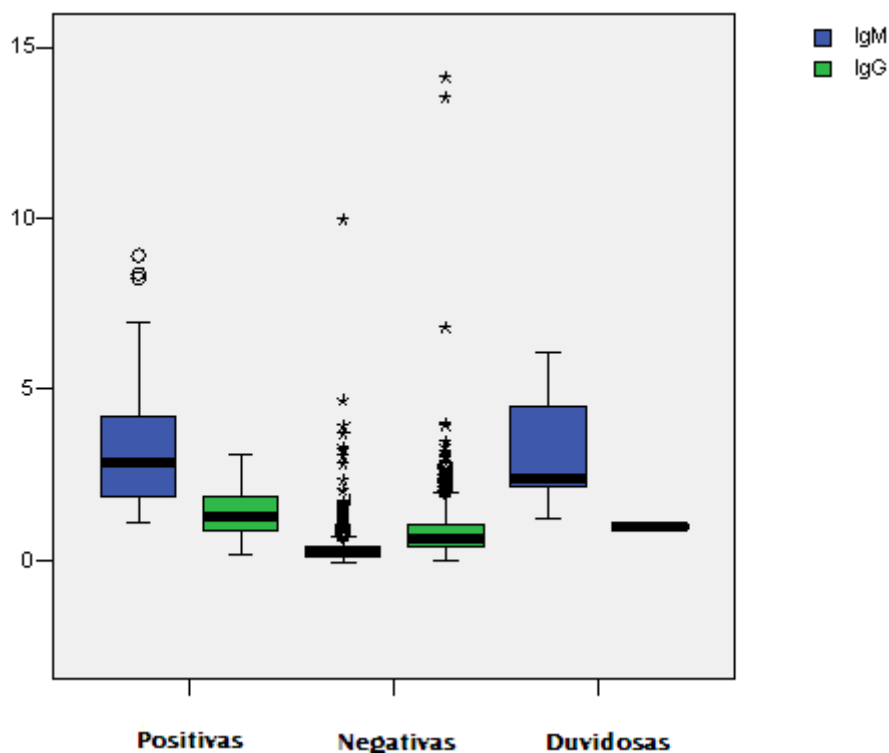


Figura 14. Caixa-de-bigodes das concentrações dos anticorpos IgG e IgM (positivas, negativas e duvidosas) (Unidades Virotec, VE) contra o vírus influenza A (IAV).

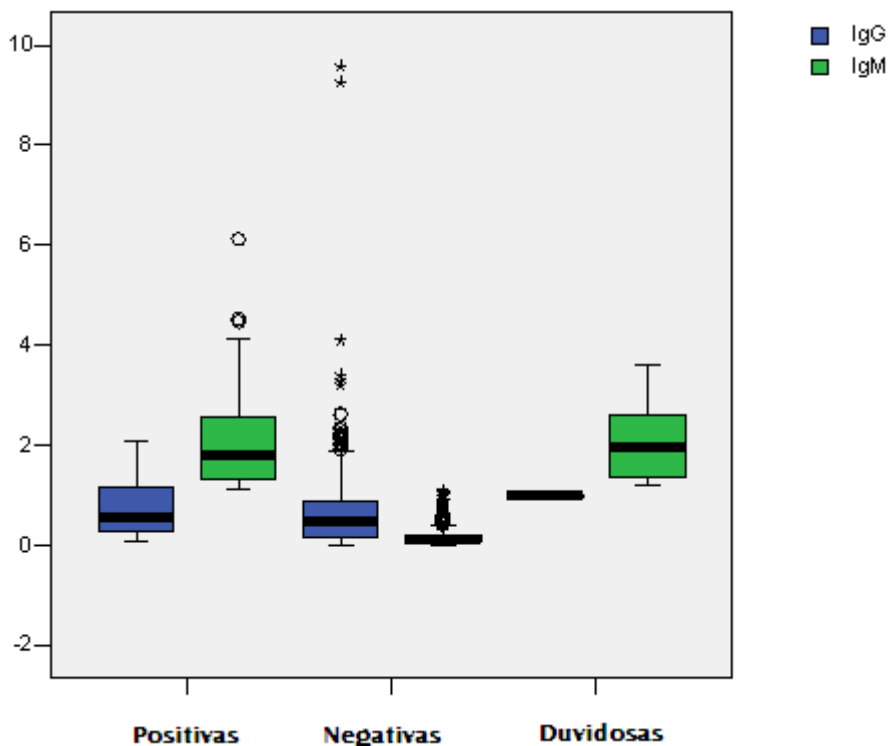


Figura 15. Caixa-de-bigodes das concentrações dos anticorpos IgG e IgM (positivas, negativas e duvidosas) (Unidades Virotec, VE) contra o vírus influenza B (IBV)

A tabela 11 apresenta a variação dos valores de IgG e IgM em relação ao IAV e IBV. Nos valores dos anticorpos IgG verificou-se uma variação entre 0 e 14,13 VE. Apesar das variações extremas, a mediana, medida de tendência central apresentou-se bastante consistente.

Relativamente ao IAV, verificou-se que, 25% dos utentes (3º quartil) com as concentrações de anticorpos mais elevadas (positivas) têm níveis detectáveis de anticorpos IgG superiores a 1,92 VE e anticorpos IgM superiores a 3,88 VE.

Os soros dos indivíduos infectados com o vírus influenza B (IBV), apresentam menores concentrações de anticorpos quando comparados com o IAV. Assim sendo, observou-se que 50% da população estudada têm concentrações de anticorpos IgG positivas superiores a 1,39 VE e a outra metade tem concentrações positivas inferiores a 1,39 VE. Verificou-se que, as concentrações negativas de anticorpos IgM no IBV foram as mais baixas, com valor da mediana de 0,12 VE.

Tabela 11. Estatística descritiva das concentrações de anticorpos IgG e IgM contra o vírus influenza A e influenza B (\bar{x} : média, σ : desvio-padrão, 1^oQ: primeiro quartil, 3^oQ: terceiro quartil).

		IgG			IgM		
		Positivas	Negativas	Duvidosas	Positivas	Negativas	Duvidosas
IAV	$\bar{x} \pm \sigma$	1,77±1,27	0,48±0,22	0,99±0,06	2,86±1,76	0,28±0,17	1,02±0,06
	Mín.	1,10	0	0,9	1,11	-0,04	0,91
	1 ^o Q	1,24	0,3	0,94	1,55	0,15	1
	Med	1,46	0,47	0,99	2,3	0,23	1,04
	3 ^o Q	1,92	0,66	1,04	3,88	0,34	1,08
	Máx.	14,13	0,89	1,09	9,96	0,89	1,09
IBV	$\bar{x} \pm \sigma$	1,60±0,94	0,36±0,25	0,99±0,05	2,11±0,94	0,18±0,16	1,04±0,05
	Mín.	1,1	-0,01	0,9	1,1	0,01	0,95
	1 ^o Q	1,23	0,12	0,94	1,32	0,08	1,02
	Med	1,39	0,31	0,98	1,85	0,12	1,05
	3 ^o Q	1,68	0,58	1,03	2,54	0,21	1,08
	Máx.	9,57	0,89	1,09	6,12	0,88	1,09

Para testar a normalidade dos dados, utilizou-se o teste de Kolmogorov – Smirnov para testar a hipótese dos dados seguirem uma distribuição normal. O teste de Kolmogorov – Smirnov baseia-se na máxima diferença entre a distribuição acumulada da amostra e a distribuição acumulada esperada. Para a distribuição ser considerada normal, o valor de p deve ser maior que 0,05; todavia, o valor calculado ($p=0,00$) (ver anexos, tabela 29) rejeita a hipótese da distribuição estudada ser normal.

A tabela 12 ilustra a distribuição qualitativa dos anticorpos IgG e IgM contra os vírus influenza A e B, de acordo com a classificação dos indivíduos por grupos. A maior percentagem de indivíduos com concentrações de anticorpos superiores a 1,1 VE é de 25,1% e diz respeito aos 246 utentes com doseamento realizado para o anticorpo IgG contra a influenza A. No rastreio do vírus influenza B, dos 270 indivíduos com avaliação serológica positiva, 18,2% têm anticorpos IgG e 9,6% anticorpos IgM.

Tabela 12. Distribuição qualitativa dos anticorpos IgG e IgM contra IAV e IBV na amostra estudada da população de acordo com o algoritmo definido na tabela 10. Os números representam os valores absolutos dos indivíduos testados. As percentagens estão dadas entre parêntesis.

	Positivo VE \geq 1,1		Negativo VE < 0,9		Duvidoso 0,9 \leq VE < 1,1		TOTAL	
	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM	IgG	IgM
IAV	246	127	630	824	105	15	981	966
	(25,1%)	(13,1%)	(64,2%)	(85,3%)	(10,7%)	(1,6%)	(100%)	(100%)
IBV	178	92	732	860	67	10	977	962
	(18,2%)	(9,6%)	(74,9%)	(89,4%)	(6,9%)	(1%)	(100%)	(100%)

A análise estatística dos dados permite-nos obter uma ampla perspectiva geral da prevalência serológica dos vírus influenza. No entanto, estes resultados devem ser considerados sempre como um componente suplementar de diagnóstico enquadrados no âmbito de uma avaliação clínica. Nesse sentido, e segundo a interpretação dos resultados serológicos, classificamos como caso positivo de infecção provocada pelo vírus influenza A e/ou B, os indivíduos que exibam simultaneamente concentrações positivas dos anticorpos IgG e IgM e os indivíduos que embora tenham anticorpos IgG sem concentração significativa, apresentam valores positivos para os anticorpos IgM, como ilustrado na tabela 13. Embora, um diagnóstico definitivo só seja possível, considerando tanto a anamnese como também os dados clínicos e laboratoriais.

Tabela 13. Interpretação dos resultados serológicos resultantes do doseamento de anticorpos IgG e IgM.

Anticorpos		Diagnóstico
IgG (+)	IgM (-)	infecção crónica / imunidade / infecção antiga
IgG (+)	IgM (+)	infecção recente ou aguda
IgG (-)	IgM (+)	infecção aguda / primo-infecção
IgG (-)	IgM (-)	susceptível ou infecção muito recente

A tabela 14, apresenta a distribuição do número de casos de acordo com a interpretação serológica dos resultados. A análise da tabela mostra que 10,7% dos indivíduos analisados adquiriu uma infecção provocada pelo vírus influenza A. Dos 977 indivíduos rastreados para o vírus influenza B, 8,2% foram considerados positivos.

Outra variante representativa de infecção, diz respeito à variante quando a IgG positiva e IgM negativa (tabela 13). Se numa segunda amostra recolhida destes indivíduos

for detectado um aumento significativo (4 vezes) do anticorpo IgG em relação à primeira colheita, então é diagnosticada uma situação de infecção, embora esta situação seja muito rara.

Tabela 14. Resultados serológicos resultantes do doseamento de anticorpos IgG e IgM.

			IAV		IBV	
IgG(+)	IgM(-)	Infecção crónica/imunidade/infecção antiga	172	(17,5%)	149	(15,3%)
IgG(+)	IgM(+)	Infecção recente ou aguda	62	(6,3%)	23	(2,4%)
IgG(-)	IgM(+)	Infecção aguda/primo-infecção	43	(4,4%)	57	(5,8%)
IgG(-)	IgM(-)	Susceptível ou infecção muito recente	572	(58,3%)	659	(67,5%)

4.1.1. Taxa de prevalência

Com o objectivo de compreender a frequência da infecção provocada pelo vírus influenza A e/ou B na população madeirense, analisou-se a taxa de prevalência. Esta taxa representa o quociente do número de casos existentes com a doença sobre o número de pessoas analisadas na população alvo, que neste caso foi calculada por cada 100.000 habitantes.

A prevalência ajuda-nos a conhecer a probabilidade – ou risco - de um indivíduo contrair determinada doença. Durante o período de estudo, registou-se uma prevalência de 41,4 casos de infecção pela influenza A e de 31,5 casos com o vírus influenza B por cada 100.000 habitantes no Arquipélago da Madeira, durante o período de estudo considerado. Uma análise mais detalhada, permite constatar que no ano de 2010 ocorreu uma maior percentagem de casos positivos, 14,3% e 11,7% para influenza A e B, respectivamente. Cerca de 10,7% da população tem possibilidade de contrair uma infecção provocada pelo vírus influenza A. Em relação ao vírus influenza B, esta percentagem é menor, tendo sido observado cerca de 8,2% de risco de infecção e doença.

4.1.2. Características demográficas

O conhecimento das características demográficas da população é um elemento fundamental na prevenção de epidemias. Na actualidade é praticamente impossível organizar uma sociedade, sem que existam dados sobre a população. No presente estudo, os dados serológicos foram analisados tendo em atenção a população residente no Arquipélago, no que concerne à sua estrutura etária e por género.

4.1.2.1. Estrutura etária

Para melhor análise dos dados, os utentes foram agrupados em faixas etárias em conformidade com recomendação do Instituto Nacional de Estatística (INE). De acordo com esta organização, os indivíduos possuem idades compreendidas entre os 0 e os 96 anos, com a média das idades de todos os indivíduos estudados de 25,8 anos.

Conforme mencionado na tabela 13, para tornar o diagnóstico de influenza mais seguro, é necessário analisar a evolução de ambos os anticorpos IgG e IgM em conjunto. Assim sendo, é possível afirmar que foram encontradas 105 pessoas com infecção provocada pelo vírus influenza A e 80 com vírus influenza B, atingindo 10,7% e 8,2% dos casos, respectivamente.

A análise da figura 16, permite constatar uma maior seroprevalência de indivíduos infectados pelo vírus influenza A e B observada na população mais idosa, chegando a alcançar valores de 20,3% para o IAV. Por outro lado, na faixa etária dos 0 aos 14 anos também podemos verificar valores elevados de indivíduos infectados aproximadamente 13% para o IAV e 10,5% para o IBV.

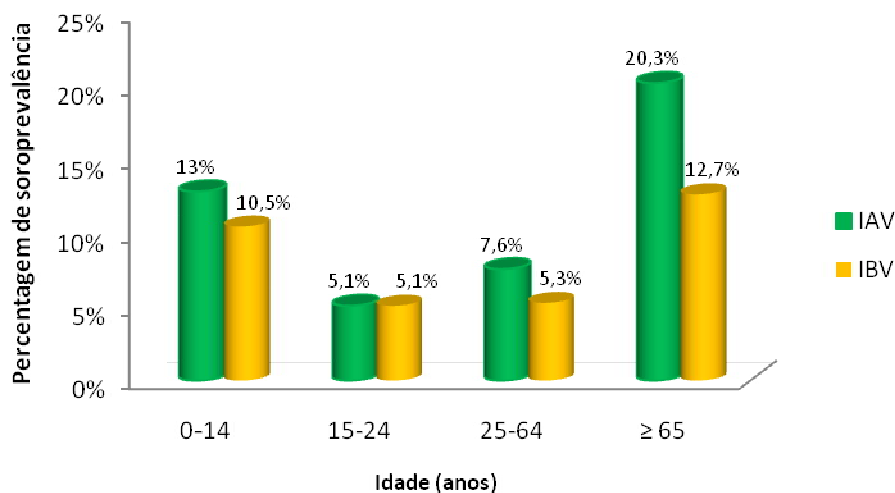


Figura 16. Seroprevalência dos anticorpos IgG e IgM contra o vírus influenza A e B por faixa etária.

A coerência de valores de infectados nos grupos etários internos, isto é, dos 15-24 e dos 25-64 anos é observada. Na faixa etária dos 15 aos 24 anos, a percentagem de infecção contraída com IAV é a mesma que para o IBV, enquanto nos restantes grupos etários os valores obtidos para IAV são superiores aos encontrados para o IBV, ou seja,

houve um maior número de pessoas contagiadas pelo vírus influenza A na amostra estudada da população.

A leitura da distribuição dos anticorpos por faixas etárias demonstra que o anticorpo IgM com valores mais elevados nas faixas etárias extremas, ou seja, dos 0-14 (15,6%) e ≥ 65 anos (23,1%) para o IAV (figura 17). A mesma distribuição é observada para o IBV, com 12,4% e 14,0%, respectivamente (figura 18).

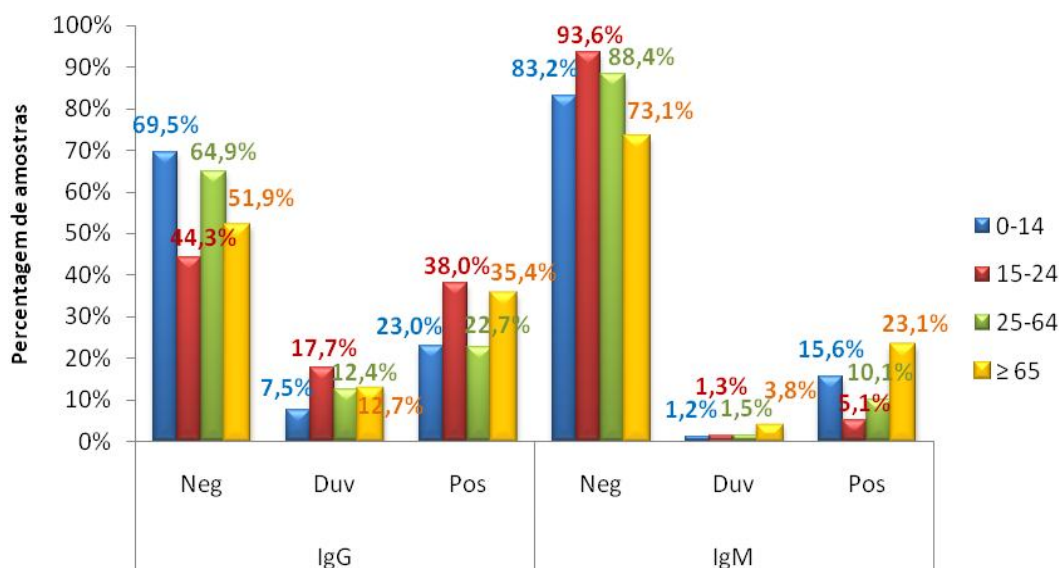


Figura 17. Avaliação da população total estudada consoante a concentração negativa (Neg), duvidosa (Duv) ou positiva (Pos) dos anticorpos IgG e IgM presentes nos soros dos utentes contra o IAV nas diferentes faixas etárias.

Estas percentagens dizem respeito aos indivíduos, com infecção em fase inicial em que os primeiros anticorpos a aparecerem são os IgM, uma vez que, são anticorpos “precoces” por serem produzidos nas fases iniciais da infecção desencadeando uma resposta imune primária.

A maior percentagem de indivíduos com concentrações de anticorpos IgG positivas encontra-se no vírus influenza A e na faixa etária dos 15 aos 24 anos, pois 38% dos casos surgem com valores elevados. Esta percentagem representa os indivíduos que já estiveram em contacto com o vírus, criando deste modo defesas contra este antigénio.

A figura 17 indica que a faixa etária referente à população com idade superior aos 65 anos tem a maior percentagem de amostras com doseamentos positivos de anticorpos, excepto para o anticorpo IgG na presença de influenza A (35,4%).

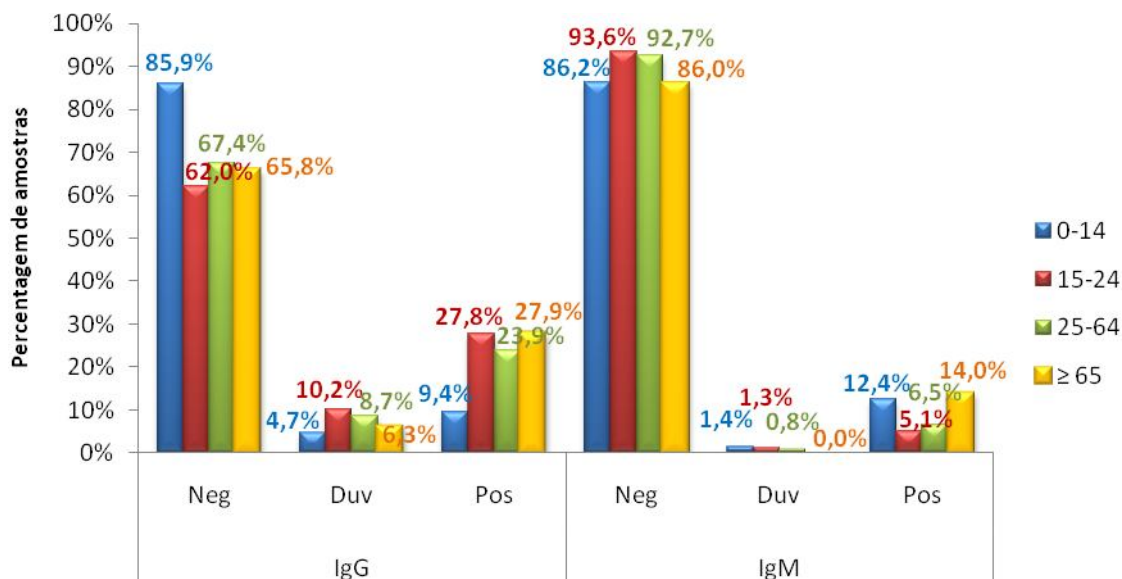


Figura 18. Avaliação da população total estudada consoante a concentração negativa (Neg), duvidosa (Duv) ou positiva (Pos) dos anticorpos IgG e IgM presentes nos soros dos utentes contra o IBV nas diferentes faixas etárias.

Outra observação prende-se com o facto de, o anticorpo IgM, presente na infecção aguda da doença, apresentar valores positivos mais baixos do que o anticorpo IgG, tanto para IAV como para IBV, à excepção da faixa etária dos 0 aos 14 anos para o IBV. Esta distribuição demonstra que a maioria da população estudada, onde foram detectadas concentrações de anticorpos positivas, já esteve em contacto com a doença, possuindo, protecção contra a infecção.

Os casos duvidosos representam apenas 5,7% da população estudada, ou seja, os utentes com concentrações de anticorpos na zona de fronteira entre o cut-off positivos e negativos, e devem repetir a análise de rastreio.

A análise dos casos positivos consoante a idade revela a existência de dois grupos com maior número de casos positivos, são eles os grupos dos 0-14 anos e dos ≥ 65 anos. O teste de independência (teste qui-quadrado de Pearson) permitiu aferir que existe associação entre a idade e a contracção da doença ($p=0,001$) (ver anexos, tabela 30). À semelhança do observado no caso do IAV, também para o IBV foi detectada a associação entre o grupo etário e a contracção da doença ($p=0,01$) (ver anexos, tabela 31), isto é existem grupos com maior preponderância de casos positivos.

O comportamento serológico dos anticorpos IgG e IgM de ambos os vírus em crianças muito pequenas foi analisado, seleccionando-se as seguintes faixas etárias: 0 a 3 meses, 3 a 6 meses e 6 a 11 meses. Nesta amostragem, foram avaliadas 67 crianças entre os 0-3 meses, 24 entre os 3-6 meses e 35 com idade compreendida entre os 6 e os 11

meses. A relação entre a imaturidade do sistema imunitário do recém-nascido e a sua maior susceptibilidade às infecções bacterianas, virais e protozoárias está amplamente documentada, de modo que os recém-nascidos parecem ser particularmente vulneráveis a lesões causadas directamente pelos mecanismos imunológicos ou por agentes infecciosos. Deste modo, o conhecimento do sistema imunológico do recém-nascido e as suas limitações é de grande importância no que se refere à prevenção de infecções.

A IgM é a primeira classe de imunoglobulinas produzida numa resposta imune primária, sendo uma classe de anticorpos "precoces" produzidos nas fases iniciais das doenças agudas que desencadeiam a resposta humoral. A presença de anticorpos IgM pode indicar infecção, contudo não é suficiente para o diagnóstico visto que o recém-nascido pode produzi-los tardiamente. Neste caso o ideal é fazer um outro exame. Os anticorpos da classe IgM geralmente aparecem em torno de 5 dias após o contacto com o antigénio, desaparecendo depois em semanas ou meses.

A análise da figura 19, demonstra que a maioria das crianças apresentam concentrações de anticorpos não significativas, isto é IgM negativa. Os níveis mínimos dos anticorpos IgM contra IAV ao nascer aumentaram com a idade (0-3 meses: 1,5%; 3-6 meses: 9,1% e 6-11 meses: 14,3%). Na mesma proporção, observou-se um decréscimo nas concentrações negativas de IgM (0-3 meses: 98,5%; 3-6 meses: 90,9% e 6-11 meses: 85,7%). Isto revela que, com o aumento da idade, verificou-se um acréscimo nas concentrações de anticorpos IgM no organismo das 126 crianças analisadas.

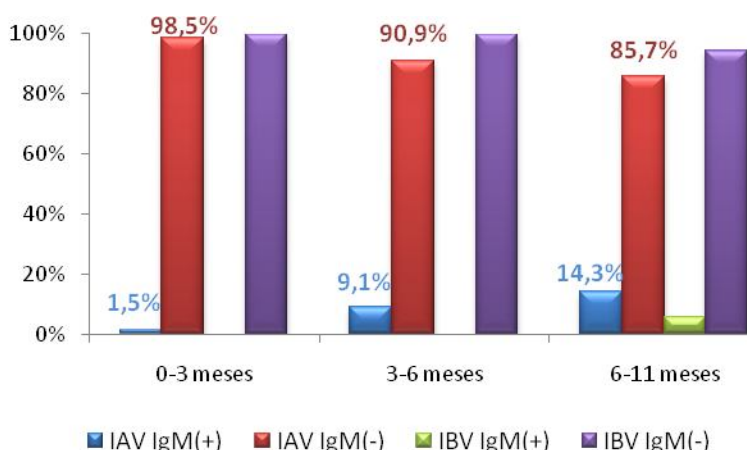


Figura 19. Comportamento dos anticorpos IgM nas 126 crianças estudadas com idade inferior a 1 ano para serologia viral contra IAV e IBV.

Os níveis de imunoglobulinas G foram determinadas, mas uma vez que a IgG materna protege o recém-nascido até que o sistema imunitário deste possa produzir os

seus próprios anticorpos, os valores de IgG não tem valor de diagnóstico, pois ocorre transferência pela placenta do IgG da mãe. Esta transferência placentária confere uma elevada imunidade passiva ao recém-nascido e é um processo activo e limitado à IgG.

O anticorpo IgG ocorreu em pequenas percentagens em ambos os vírus, embora com comportamentos distintos (figura 20). Para o IAV, as concentrações positivas de IgG diminuíram com a idade das crianças (0-3 meses: 9,5%; 3-6 meses: 8,3% e 6-11 meses: 2,9%). No IBV, verificou-se que a partir dos 3 meses de vida, os níveis de IgG caíram até valores mínimos e após os 6 meses ocorreu uma elevação progressiva posterior até um ano de vida (0-3 meses: 6,3%; 3-6 meses: 0% e 6-11 meses: 2,9%).

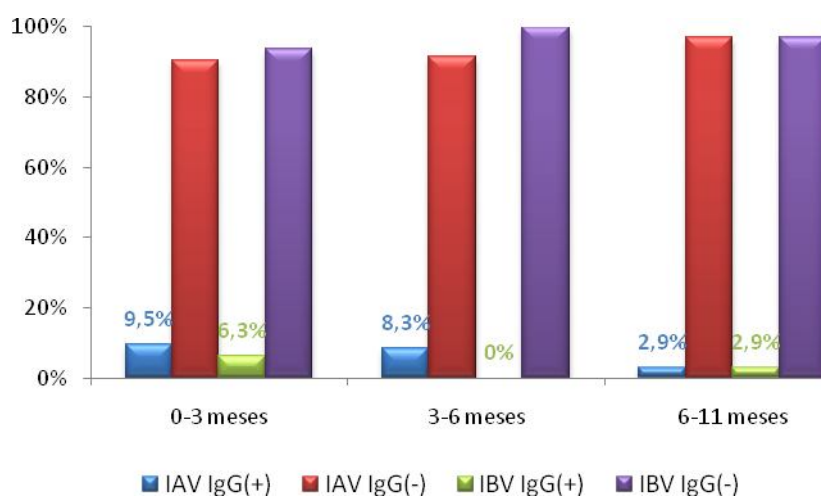


Figura 20. Comportamento dos anticorpos IgG nas 126 crianças estudadas com idade inferior a 1 ano para serologia viral contra IAV e IBV.

Os anticorpos da classe IgG aparecem 1 a 2 semanas após a infecção e persistem por toda a vida. A detecção desses anticorpos IgG em mulheres, indicando infecção passada, afasta o risco delas produzirem infecção congénita. No entanto, mulheres com serologia negativa devem ser consideradas um grupo de risco e acompanhadas durante toda a gestação.

4.1.2.2. Estrutura sexual

A estrutura sexual da amostragem populacional estudada do Arquipélago da Madeira durante o período compreendido entre 1 de Abril de 2009 e 30 de Abril de 2011 é apresentada na figura 21.

2012



Figura 21. Gráfico da distribuição dos 981 indivíduos analisados por género durante o período de estudo.

Segundo dados dos Censos 2011, as mulheres representam 52% do total da população, e como tal, é interessante verificar que esta proporção no número de casos estudados é observada em 2011. Tanto em 2009 como em 2010, houve uma maior percentagem de casos masculinos analisados em relação aos anticorpos IgG e IgM contra o IAV e o IBV, atingindo 57,2% e 53% dos casos, respectivamente.

A tabela seguinte indica os resultados obtidos para os casos de indivíduos infectados com IAV e IB de acordo com o sexo. Assim, temos que, dos 529 indivíduos masculinos testados serologicamente, 46 (8,7%) contraíram infecção pelo IAV e 36 (6,8%) pelo IBV. Relativamente ao sexo feminino, verificou-se que do total de 452 amostras analisadas, 59 (13,1%) estavam infectados pelo IAV e 44 (9,7%) pelo IBV (tabela 15 e figura 22).

Tabela 15. Resultados referentes aos casos infectados por IAV e IBV de acordo com o género.

	Nº total de amostras	IAV (+)			IBV (+)		
		IgG(+)/IgM(+)	IgG(-)/IgM(+)	Total	IgG(+)/IgM(+)	IgG(-)/IgM(+)	Total
F	452	34	25	59 (13,1%)	9	35	44 (9,7%)
M	529	28	18	46 (8,7%)	14	22	36 (6,8%)
Total	981	62	43	105 (10,7%)	23	57	80 (8,2%)

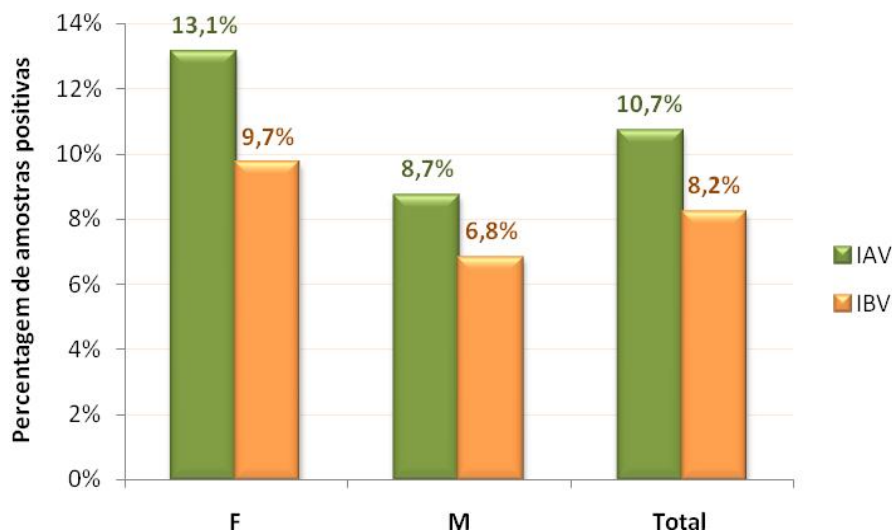


Figura 22. Seroprevalência dos anticorpos IgG e IgM contra IAV e IBV por sexo.

A leitura da figura 22 e tabela 15 indica que 10,7% dos indivíduos com infecção provocada pelo IAV, cerca de 13,1% do sexo feminino e 8,7% do sexo masculino, sendo este o vírus mais prevalente em ambos os sexos. Conforme ilustrado, a menor seroprevalência é observada nos homens para o IBV, com 6,8% dos indivíduos do sexo masculino a contraírem infecção pela influenza B.

O valor p do teste de independência Qui-quadrado de Pearson permite afirmar que existem diferenças significativas entre os sexos e a contracção da doença para o IAV ($p=0,027$) (ver anexos, tabela 32); sendo assim é mais provável uma mulher contrair infecção por IAV que um homem. Relativamente ao IBV, o teste de independência não permite aferir que as mulheres têm maior probabilidade de contrair a doença ($p=0,069$) (ver anexos, tabela 33). O risco associado ao facto de ser mulher foi calculado e conclui-se que as mulheres têm mais 1,5 vezes mais probabilidades de contrair a doença do que o homem (odd ratio = 1,576).

Os testes de associação para determinar se a distribuição do número de amostras positivas era igual entre homens e mulheres obtiveram valores superiores a 0,05, pelo que não existe associação.

O gráfico da figura 23 reflecte a prevalência dos anticorpos IgG e IgM em amostras analisadas para detecção de infecção por IAV. Pela análise do gráfico, podemos observar que, as percentagens obtidas para as diferentes concentrações de IgG e IgM (negativa, duvidosa e positiva) são similares para ambos os sexos.

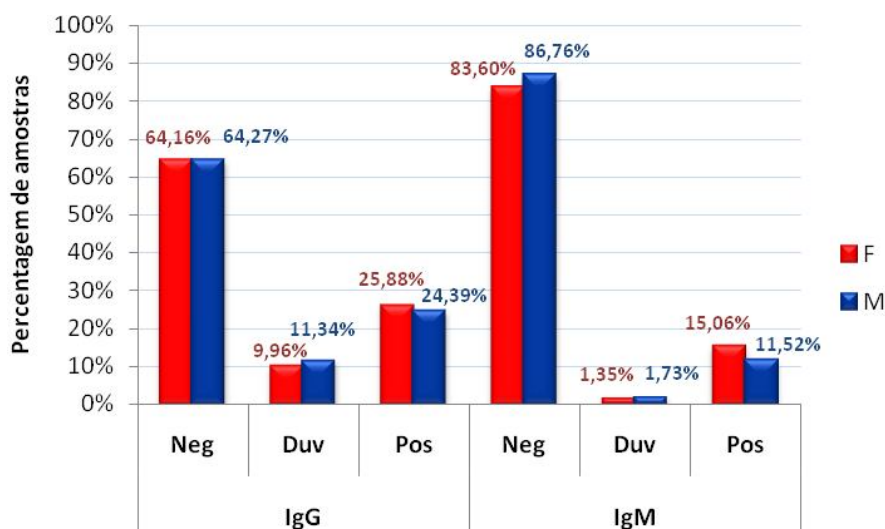


Figura 23. Avaliação da população total estudada consoante a concentração negativa (Neg), duvidosa (Duv) ou positiva (Pos) dos anticorpos IgG e IgM presentes nos soros dos utentes contra o IAV consoante o sexo.

Relativamente ao IBV (figura 24), é verificada a mesma situação, ou seja valores muito próximos entre ambos os sexos.

Tanto para IAV como IBV foram obtidas elevadas percentagens de concentrações negativas do anticorpo IgM. Curioso verificar que, os casos duvidosos são menos frequentes relativamente ao anticorpo IgM.

Verificou-se que, os indivíduos do sexo feminino apresentam maior percentagem de concentrações positivas, excepto nos anticorpos IgG detectados contra IBV (F: 16,44%; M: 19,73%).

2012

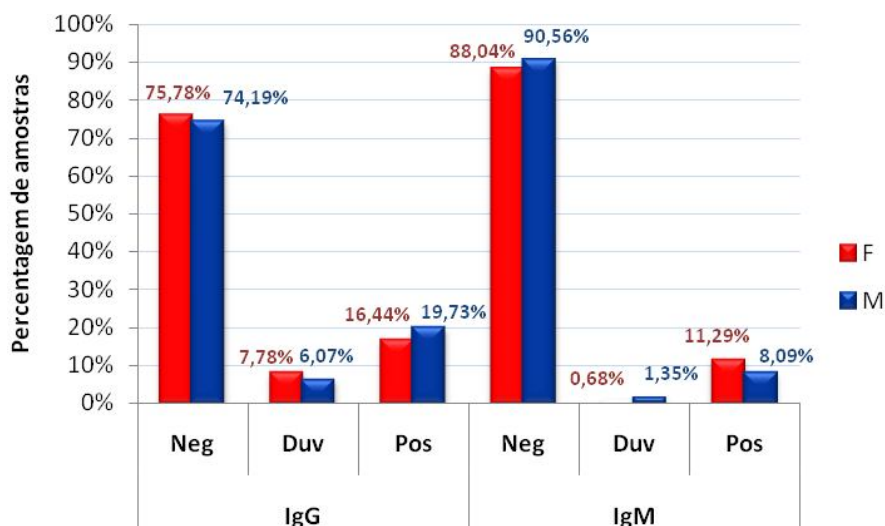


Figura 24. Avaliação da população total estudada consoante a concentração negativa (Neg), duvidosa (Duv) ou positiva (Pos) dos anticorpos IgG e IgM presentes nos soros dos utentes contra o IBV consoante o sexo.

4.1.3. Distribuição geográfica

A distribuição geográfica regional dos casos diagnosticados foi analisada. A figura 25, permite aferir que, que o concelho do Funchal (49,03%) é o concelho com o maior número de pedidos para diagnóstico do vírus influenza, seguido por Santa Cruz (15,80%) e Câmara de Lobos (15,09%). Estes valores devem-se ao facto de o Funchal ser o concelho mais densamente povoado e da tendência para a concentração da população em zonas urbanas em redor do Funchal, em detrimento das zonas rurais.

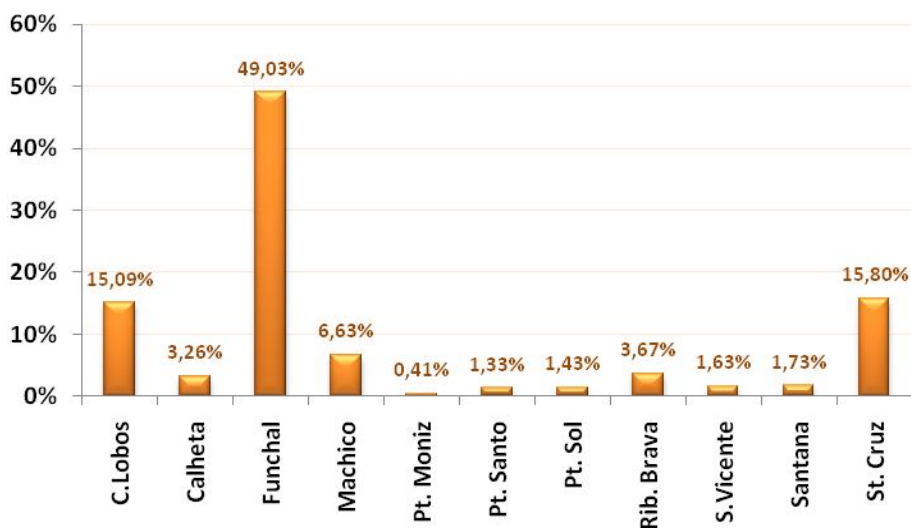


Figura 25. Distribuição da amostragem populacional total de 981 indivíduos analisados pelos 11 concelhos do Arquipélago da Madeira.

Em contraste, o concelho do Porto Moniz, por ser o menos densamente povoado (32,7 hab/km²), também é o que tem menos amostras testadas, tendo sido analisados apenas 4 indivíduos nos 25 meses de estudo. Numa análise refinada, agrupou-se as zonas urbanas (Funchal, Câmara de Lobos e Santa Cruz) e as zonas rurais (Calheta, Machico, Porto Moniz, Porto Santo, Ponta de Sol, Ribeira Brava, São Vicente e Santana) e, verificou-se que 91% das 981 amostras testadas no Laboratório de Patologia Clínica foram originárias das zonas consideradas urbanas.

Com a intenção de monitorizar a dispersão geográfica da influenza, estudou-se a distribuição percentual dos indivíduos com diagnóstico confirmado de pelos diferentes concelhos. Considerando o número de amostras positivas de cada concelho foi calculada a percentagem que indica o número de casos positivos sobre o total de amostras. Assim podemos afirmar que os concelhos de Santana (29,41%), São Vicente (18,75%) e Machico (16,92%) foram os que apresentaram maior percentagem de casos com aumento significativo na concentração de anticorpos para o IAV (figura 25). Os concelhos com as temperaturas médias anuais do ar mais baixas foram os que manifestaram maior número de indivíduos infectados com o IAV. É curioso, uma vez que, o clima mais frio do inverno cria condições mais favoráveis para a transmissão da influenza, que consegue permanecer por mais tempo no ar e percorrer distâncias maiores dentro de gotículas de saliva, aumentando as probabilidades de infecção.

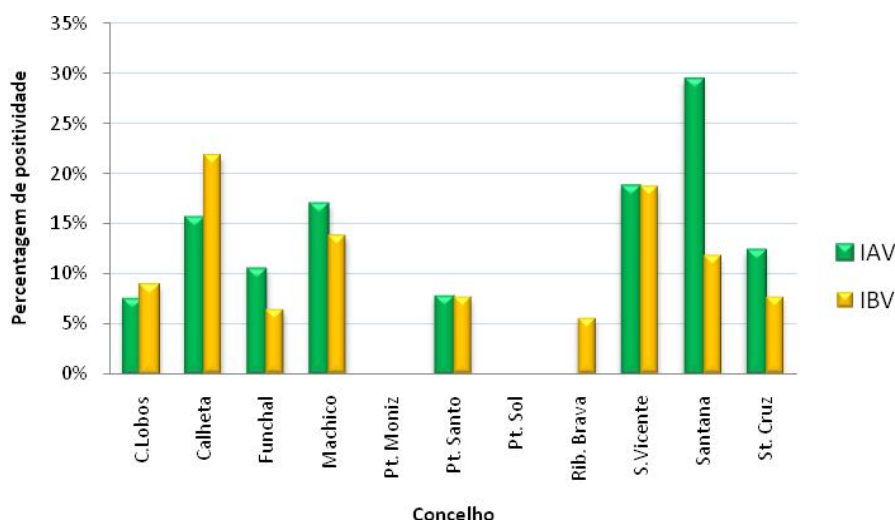


Figura 25. Distribuição percentual das amostras positivas pelos 11 concelhos do Arquipélago da Madeira segundo o tipo de vírus causador da doença.

A análise da figura 25 permite aferir que, em relação ao vírus influenza B, o concelho com maior número de casos diagnosticados foi o da Calheta (21,88%), pois num universo de apenas 32 amostras provenientes deste concelho, 7 foram positivas para IBV, seguido por São Vicente (18,75%) e Machico (13,85%) (figura 26). Em relação, às zonas urbanas, o Funchal surgiu como o concelho com a menor percentagem de indivíduos infectados por IBV.



Figura 26. Distribuição geográfica regional dos casos infectados por IAV (verde) e IBV (amarelo).

4.1.4. Distribuição temporal

O estudo da distribuição temporal dos vírus influenza nas comunidades é importante na elaboração de estratégias de prevenção, permitindo assim uma melhor compreensão da epidemiologia. Este tem como objectivo analisar o modelo de distribuição temporal dos vírus influenza A e B durante o período em estudo.

A figura 27 apresenta a percentagem de casos positivos com IAV ao longo dos 25 meses do estudo. No gráfico são realçadas as épocas de gripe, com finalidade de conhecer o comportamento dos vírus nesses períodos específicos. Para melhor compreensão e segundo o Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) foi designada por *época de gripe*, o período de aproximadamente 24 semanas que decorre entre o início de Outubro de um ano (semana 40^a) e o final de Março do ano seguinte (semana 13^a).

2012



Figura 27. Distribuição temporal da prevalência de indivíduos com IAV e IBV durante o período de estudo.

A análise demonstra que no ano de 2010, registou-se o maior número de casos positivos com IAV, sendo registados mais casos nos primeiros três meses do ano, e voltando a observar-se um pico no mês de Julho. O acréscimo de casos foi registado desde Setembro de 2009 até Janeiro de 2010.

Durante a época de gripe 2009/2010, o pico de casos assinalados com a doença foi registado em Janeiro de 2010. Neste mês entre os 54 indivíduos testados, 12 apresentaram resultados positivos para infecção com o IAV. Após este pico, foi assinalado um decréscimo no número de casos investigados até Maio de 2010, voltando a observar-se uma nova subida no mês de Junho e um pico máximo em Julho de 2010 com a mesma percentagem verificada em Janeiro (22,2%). A mesma dinâmica é observada em relação à época de gripe 2010/2011. Neste período, verificou-se que a percentagem de casos positivos não atingiu os mesmos valores da época de 2009/2010. Valores de prevalência superiores a 10,8% foram observados em Novembro de 2010. Durante estas 24 semanas de rastreio da gripe, o número de casos positivos por infecção através do IAV mantiveram-se consistentes e a partir do final deste período (Março de 2011), podemos afirmar que não se registaram novos casos.

O mesmo estudo da distribuição temporal foi realizado para a distribuição de casos positivos do vírus influenza B, a fim de melhor compreender a sua epidemiologia. A figura 27 torna evidente que o número de casos positivos de IBV não apresenta um carácter cíclico, pois em alguns períodos não se diagnosticaram casos positivos. O primeiro caso de infecção pelo IBV foi registado em Julho de 2009. A época de gripe de 2009/2010 foi assinalada com incremento na percentagem de casos positivos entre Outubro de 2009 Março de 2010 (pico máximo) com 14 infectados (17,3%). Durante a época de gripe 2010/2011 foram detectados dois picos máximos de prevalência, no início

(Outubro de 2010) e fim (Março de 2011). Nos meses de Setembro de 2010 e Abril de 2011, que antecedem e sucedem a esta época, não foi registado qualquer indivíduo infectado por IBV.

Durante a época de gripe 2009/2010, a maior prevalência de casos positivos para IAV e IBV, registou-se nos últimos meses deste período, ou seja, em Janeiro de 2010 (22,2%) e Março de 2010 (17,3%), respectivamente. Por outro lado, na época de gripe 2010/2011, as maiores prevalências foram registadas, logo no início deste período, nos meses de Novembro de 2010 (10,8%) e Outubro de 2010 (17,4%) para IAV e IBV, respectivamente.

A sobreposição das distribuições temporais dos casos diagnosticados demonstra que, o comportamento de ambos os vírus, entre Abril de 2009 e Junho de 2010 foi análogo, verificando-se um acréscimo acentuado desde Setembro de 2009 até Janeiro de 2010 (figura 27). No início da época de gripe 2010/2011, observou-se que o vírus a surgir primeiro, com maior percentagem de indivíduos infectados foi o IBV em Outubro de 2010. O IAV apareceu no mês seguinte com a maior prevalência registada para este vírus (10,8%). A partir desse mês, a prevalência de ambos mantém-se consistente até final de Fevereiro de 2011.

O teste não-paramétrico Mann-Whitney foi aplicado para comparar as médias de duas variáveis independentes. Este teste permite aferir que existem diferenças significativas entre a época do ano e a contracção da gripe para IAV ($p=0,009$) (ver anexos, tabela 34), ou seja é mais provável um indivíduo contrair a infecção por IAV durante a época de inverno (Outubro – Março). Relativamente ao IBV, o valor de p obtido ($p=0,942$) (ver anexos, tabela 35), não permite aferir qual a época do ano mais propícia à infecção pelo IBV.

4.1.5. Manifestações clínicas

A gravidade da influenza é bastante variável, causando desde quadros de rinofaringite leve até pneumonia viral com complicações fatais. A presença de febre acompanhada de manifestações respiratórias e sintomas sistémicos como dores musculares, calafrios ou fadiga auxiliam muito na distinção da influenza de outras infecções respiratórias, porém não são suficientemente específicos para um diagnóstico seguro.

O hábito de chamarmos "gripe" a todas as constipações contribui para se confundir a gripe, doença causada pelo vírus influenza, com as centenas de outras

constipações, provocadas por vírus respiratórios. Por ser frequentemente confundida com outras viroses respiratórias, a Classificação Internacional de Problemas de Saúde nos Cuidados Primários (ICHPPC-II) diferencia os casos de síndrome gripal dos casos de gripe [74]. A definição de Síndrome Gripal foi actualizada pelo Conselho Europeu, através da Decisão 2008/426/EC [75] que emenda a Decisão 2002/253/EC [76]. Esta nova definição está de acordo com os critérios apresentados na tabela 16.

Tabela 16. Distinção entre síndrome gripal e gripe.

Caso de síndrome gripal	Caso de gripe
Um dos seguintes sintomas sistémicos: <ul style="list-style-type: none"> • Febre • Mal-estar • Debilidade • Prostração • Cefaleia • Mialgia • Dores generalizadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Início súbito de febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$) ou história de febre nos últimos dias e, pelo menos, dois dos seguintes sintomas: • Tosse • Cefaleias • Odinofagia • Mialgias/artralgias • Rinorreia • Vômitos/diarreia
Mais um dos seguintes sintomas sistémicos: <ul style="list-style-type: none"> • Tosse • Dor de garganta ou inflamação da mucosa nasal ou faríngea sem sinais respiratórios relevantes • Dificuldade respiratória 	<ul style="list-style-type: none"> • Doença respiratória aguda grave (incluindo pneumonia) sugestiva de etiologia infecciosa

Na análise da tabela 17, estão enumerados os sintomas/diagnósticos atribuídos aos utentes durante a consulta médica.

Tabela 17. Sintomas/diagnósticos e respectiva relação entre estes e o número de casos positivos em IAV e IBV.

Sintomas / diagnósticos	Nº de indivíduos com sintomas	Nº total de casos positivos (%)	
		IAV (+)	IBV (+)
Febre	174	27 (15,5%)	16 (9,2%)
Convulsão febril	3	1 (33,3%)	1 (33,3%)
Hipertermia	2	0 (0%)	1 (50%)
Tosse	15	0 (0%)	0 (0%)
Cefaleias	1	0 (0%)	0 (0%)
Mialgia	5	0 (0%)	0 (0%)

Vómitos/Diarreia	3	1 (33,3%)	0 (0%)
Odinofagia	1	0 (0%)	0 (0%)
Infeção Respiratória	26	4 (15,4%)	2 (7,7%)
Asma	8	0 (0%)	1 (12,5%)
Bronquiolite/bronquite	50	4 (8%)	3 (6%)
Pneumonia	171	20 (11,7%)	17 (9,9%)
HIV	25	0 (0%)	0 (0%)
Hepatite	8	1 (12,5%)	2 (25%)

Dos 492 indivíduos com sintomas/diagnóstico descrito, 174 (35,4%) descrevem episódios de febre e 171 (34,8%) foram diagnosticados com pneumonia.

Note-se que, dos indivíduos que apresentaram febre, 27 (15,5%) eram casos positivos para IAV e 16 (9,2%) para IBV. Relativamente aos utentes com pneumonia, cerca de 11,7% estavam infectados com IAV e 9,9% com IBV. Interessa referir que, em ambas as situações (febre e pneumonia), o IAV apresenta maiores percentagens que IBV.

Outra situação de interesse são os indivíduos diagnosticados com bronquiolite/bronquite. Dos 50 utentes analisados, 8% contraiu a infecção por IAV e 6% por IBV.

Refira-se que, dos 21 indivíduos com tosse (15), cefaleia (1) e mialgia (5) nenhum deles estava infectado pelo vírus influenza.

Uma outra situação a mencionar são os indivíduos imunodeprimidos (HIV e hepatite). Nenhum dos indivíduos com HIV analisados estava infectado com gripe e 2 (25%) tinham contraído a infecção por IBV.

4.1.6. Infecções concomitantes

Uma infecção concomitante é uma infecção provocada por mais de um agente infeccioso ao mesmo tempo. Neste caso, analisou-se os indivíduos que durante o período de estudo apresentaram infecção provocada por IAV e IBV. Conforme revela a tabela 18, as infecções concomitantes foram observadas em 59 das 981 amostras estudadas, o que equivale a 6% do total de amostras.

Tabela 18. Análise das amostras com infecção simultânea por IAV e IBV

IAV	IgG(+)/IgM(+)	IBV	IgG(+)/IgM(+)	14
			IgG(-)/IgM(+)	29
	IgG(-)/IgM(+)	IBV	IgG(+)/IgM(+)	4
			IgG(-)/IgM(+)	2
Total			59 indivíduos com coinfeção por IAV e IBV	

Numa época de gripe, é possível que surjam pacientes co-infectados com mais de um tipo de vírus influenza e que estes desenvolvam anticorpos contra ambos os vírus, embora crê-se que o grau de resposta dos anticorpos possa ser inferior à resposta resultante de uma infecção provocada por um só vírus.

4.2. Detecção da infecção provocada pela gripe A (H1N1) 2009

Relativamente à detecção da infecção provocada pela gripe A (H1N1) 2009, efectuou-se a revisão dos registos médicos (Gripe OT-4.1) (ver anexos) de todos os doentes com amostras submetidas para procedimentos de diagnóstico laboratorial no âmbito da pandemia pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009.

Deste modo, a amostragem analisada na Secção de Biologia Molecular do Laboratório de Patologia Clínica entre Julho de 2009 e Julho de 2010 foi constituída por 1934 amostras de todos os doentes com síndrome gripal incluídos na definição de caso para investigação.

As primeiras amostras para detecção de gripe A(H1N1) 2009 foram acondicionadas e enviadas de imediato ao Laboratório Nacional de Referência. Após, uma acção de formação organizada pelo Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe do INSA necessária para harmonizar as metodologias laboratoriais de diagnóstico virológico, obteve-se todas as condições para realizar este diagnóstico no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça. Uma vez, operacionalizados os procedimentos e avaliadas as necessidades, o Hospital Dr. Nélio Mendonça passou a integrar a rede nacional para o diagnóstico laboratorial da infecção pelo vírus da gripe A (H1N1) 2009.

Os resultados foram obtidos por PCR-RT com base na fluorescência emitida pela sonda TaqMan (marcada com o fluoróforo FAM) e colectados ao longo dos 45 ciclos de reacção, indicando a detecção dos genes em análise. Os resultados do teste foram interpretados da seguinte forma:

- se somente o alvo do gene da proteína da matriz universal (**InfA**) do vírus Influenza A for detectado, indica a presença do vírus da Influenza A sazonal (gripe comum);
- se ambos os alvos (**InfA**) e (**swInfA**) forem detectados, indica a presença de um vírus, de origem suína, da Influenza A porém não pertencente ao tipo H1N1
- se os três alvos (**InfA**), (**swInfA**) e (**swH1**) forem detectados indica a presença do vírus da Influenza A suína (H1N1)v 2009.

Em resultado da análise, todas as amostras devem apresentar reacção positiva ao gene da **RNase P** humana, indicando que o processo de colheita da amostra e extracção do RNA foram adequados. Uma amostra é considerada positiva para o vírus influenza A (H1N1) 2009 origem suína se for positiva nas quatro reacções de RT-PCR (**InfA** , **swInfA** , **swH1** e **RNase P**).

4.2.1. Taxa de prevalência

De modo análogo ao ponto 4.1.1., também aqui far-se-á uma abordagem para compreender o quanto é, comum ou rara, a infecção provocada pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) nos utentes analisados.

De acordo com a figura 28, durante o período em estudo, registou-se uma prevalência média de 28,1 casos de infecção pela gripe pandémica A (H1N1) 2009 por cada 10.000 habitantes, do Arquipélago da Madeira. A Região Autónoma da Madeira possui uma população residente de 265 785 habitantes de acordo com os Censos 2011.

Estes dados indicam que cerca de 38,6% da população esteve em risco de contrair uma infecção provocada por este vírus e consequente doença.

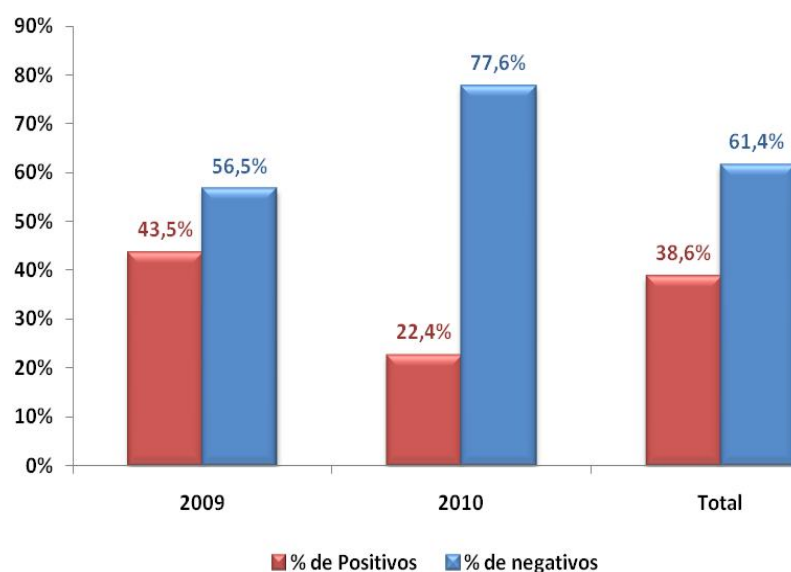


Figura 28. Taxa de prevalência do vírus pandémico A (H1N1) 2009 na amostragem populacional estudada.

4.2.2. Características demográficas

Os dados relativos à gripe pandémica serão analisados com base nos dados da população residente no Arquipélago na Madeira e no que concerne à sua estrutura sexual e etária.

4.2.2.1. Estrutura etária

Segundo o estudo da distribuição dos utentes por faixas etárias, verificou-se que a idade dos indivíduos varia dos 0 aos 96 anos (tabela 19), com a média de idades de 24,8 anos.

Tabela 19. Estatística descritiva sobre a idade dos 1934 submetidos para procedimentos de diagnóstico laboratorial no âmbito da pandemia pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009 na RAM (\bar{x} : média, σ : desvio-padrão, 1ºQ: primeiro quartil, 3ºQ: terceiro quartil).

	$\bar{x} \pm \sigma$	Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Máximo
Jul-09	18,21 ± 12,73	0	8	16	25,75	42
Ago-09	31,14 ± 18,62	0	16	29	44,5	85
Set-09	33,02 ± 16,44	1	23	30	44	81
Out-09	31,02 ± 15,39	3	20,75	31	42,25	68
Nov-09	18,81 ± 16,66	0,08	7	13	29	91
Dez-09	23,68 ± 20,80	0,08	5	20	36	96
Jan-10	30,68 ± 21,56	0,08	11	30	45,5	89
Fev-10	30,13 ± 22,92	0,08	13,25	27,5	49,75	77
Mar-10	26,23 ± 21,02	0,08	15	17	32	69
Abr-10	53,33 ± 19,55	37	42,5	48	61,58	75
Mai-10	15	15	15	15	15	15
Jun-10	44	44	44	44	44	44
Jul-10	57,25 ± 14,38	37	54,25	60,5	63,5	71

Para uma melhor análise dos dados, e em conformidade com recomendação do Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC), os utentes foram agrupados em faixas etárias (figura 29).

2012

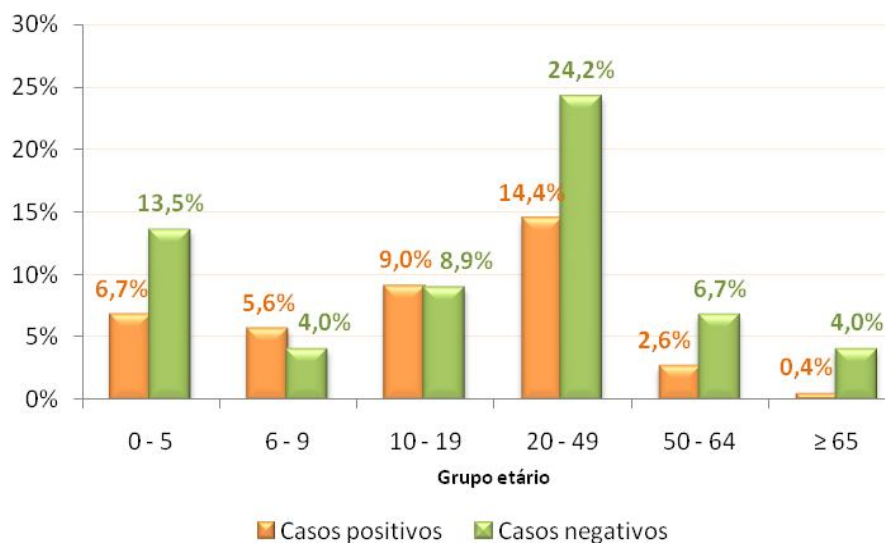


Figura 29. Distribuição do total de 1934 casos investigados para a detecção de infecção por influenza A (H1N1) 2009 na população madeirense pelas faixas etárias.

Podemos constatar que, o maior número de casos positivos manifestou-se nos indivíduos entre os 20 e os 49 anos (14,4%). A seguir segue-se a faixa etária entre os 10 e os 19, com 9,0% e em terceiro lugar, encontram-se as crianças dos 0 aos 5 anos com 6,7%. Num total de 1934 indivíduos rastreados em relação à infecção por influenza A(H1N1) 2009, verificou-se que a maioria (24,2%) dos indivíduos não estão infectados e pertencem à faixa etária dos 20 aos 49 anos. Na faixa etária dos 10 aos 19 anos, o número de casos positivos e negativos são similares. Na faixa etária dos 6 aos 9 anos, a percentagem de casos positivos é superior aos negativos, sendo esta a única faixa etária onde se verifica esta situação.

Dos 747 casos de indivíduos confirmados laboratorialmente como infectados com influenza A(H1N1) 2009, a maioria, cerca de 37,2% dos indivíduos encontram-se na faixa etária dos 20 aos 49 anos, e 23% na faixa etária dos 10 aos 19 anos.

A análise do gráfico da figura 29, permite detectar 0,4% de casos positivos a partir dos 65 anos de idade e que, mais de metade dos casos positivos têm idades inferiores a 19 anos. Uma pequena proporção de doentes (3%) com infecção pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009, tinha mais de 50 anos e 12,3% tinha menos de 9 anos. As crianças com menos de 5 anos representaram 6,7% do total de doentes com infecção diagnosticada.

4.2.2.2. Estrutura sexual

A estrutura sexual da população estudada durante o período compreendido entre Julho de 2009 e Julho de 2010 pode ser observada na figura 30. A análise dos dados permite-nos aferir que, a maior parte dos indivíduos (51%) eram do sexo masculino.

Relacionando o sexo com os grupos etários, obteve-se a figura 30. Desta análise, verificou-se que cerca de 45,9% das mulheres confirmadas laboratorialmente pertencem à faixa etária dos 20 aos 49 anos, seguida da faixa etária dos 10 aos 19, com 20,8% e em terceiro, dos 0 aos 5 anos, com 12,3%. Relativamente aos homens, a sua taxa de casos positivos manteve-se abaixo dos 28,9%. Curiosamente, os homens têm maiores percentagens de casos positivos que as mulheres até aos 19 anos, invertendo-se esta situação a partir dos 20 anos, quando as mulheres apresentam maiores percentagens de casos positivos.

A proporção entre o número de casos confirmados no sexo masculino e o número de casos confirmados no sexo feminino foi de 1,04, ou seja por cada mulher infectada com a gripe pandémica A (H1N1) 2009 existem 1,04 homens infectados.

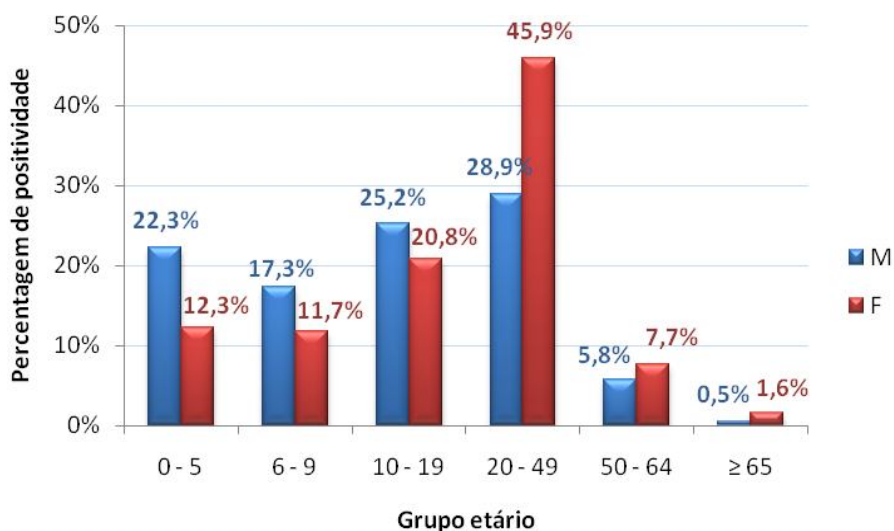


Figura 30. Distribuição da percentagem de casos positivos com influenza A(H1N1)v 2009 na população madeirense de acordo com o sexo e as faixas etárias.

4.2.1. Distribuição temporal

O primeiro caso de infecção confirmada pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009 foi diagnosticado em 13 de Julho de 2009, numa jovem de 15 anos, residente no Reino Unido e a passar férias na Madeira.

No ano de 2009 registou-se o maior número de casos confirmados com infecção pelo vírus pandémico, constituindo cerca de 33,5% da população estudada, com sintomas suspeitos de gripe A (figura 31). Durante o período em estudo, verificou-se a existência de dois picos distintos de influenza A (H1N1) 2009; um no Verão (Julho) e outro pico no Inverno (Dezembro). Dos 34 indivíduos investigados em Julho de 2009, 52,9% foram confirmados laboratorialmente. No segundo pico máximo em Dezembro de 2009 foram estudadas 711 amostras das quais 372 (52,3%) foram confirmadas com diagnóstico de infectados pela gripe pandémica.

Após elevados níveis de actividade gripal durante no mês de Julho, houve um abrandamento na percentagem de diagnósticos positivos entre os meses de Agosto e Outubro de 2009. Para depois, voltamos a observar uma ascensão gradual do número de casos, até atingirmos o pico em Dezembro de 2009. Após Dezembro de 2009, o número de casos confirmados diminuiu gradualmente até Fevereiro de 2010 e a partir de Março até Julho de 2010, foram investigados apenas 18 indivíduos, cujo diagnóstico não foi confirmado.

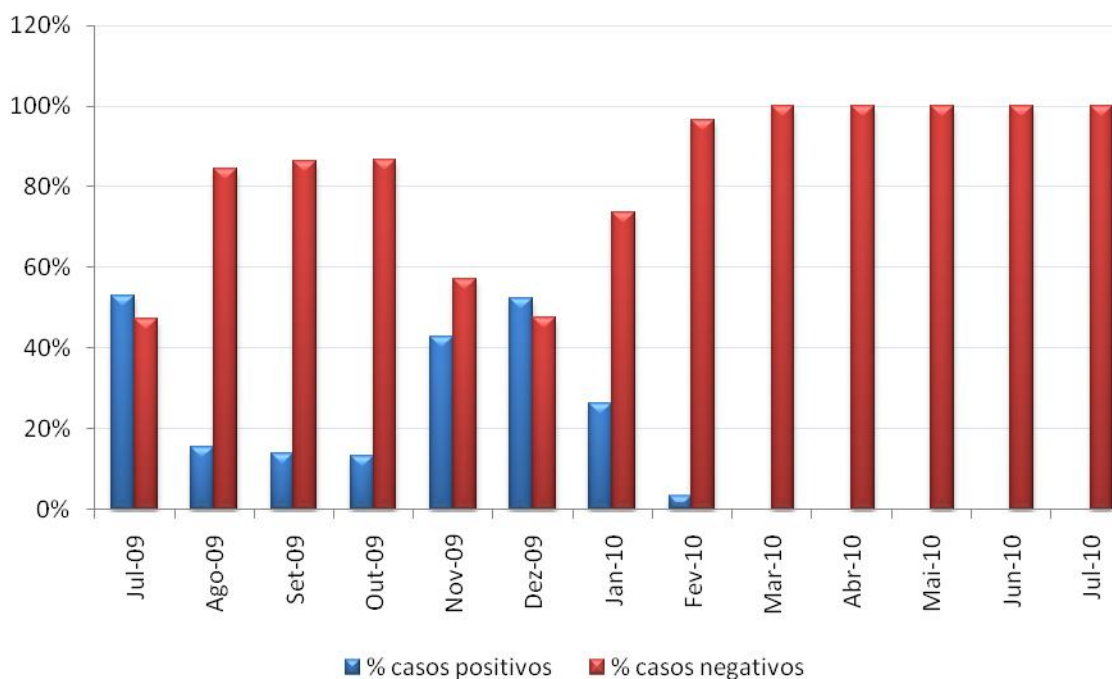


Figura 31. Evolução mensal da percentagem de resultados laboratoriais positivos e negativos para o vírus pandémico influenza A (H1N1) 2009 na Região Autónoma da Madeira.

Os meses de Novembro de 2009 a Janeiro de 2010 foram os meses com maior número de casos investigados para diagnóstico da gripe pandémica (H1N1) 2009, atingindo um máximo de 711 pessoas em Dezembro de 2009. Durante todo o período em estudo, o número de indivíduos não infectados é maior que infectados, excepto no mês de Julho e Dezembro de 2009. A razão entre infectados *versus* não infectados é de 1,13 e 1,10, respectivamente. Isto significa que, por exemplo no mês de Julho, por cada pessoa não infectada existiam 1,13 pessoas infectadas.

5. DISCUSSÃO

No presente Capítulo, são abordados os resultados obtidos no contexto dos conhecimentos actuais. Pretende-se desta forma reforçar a compreensão sobre o comportamento serológico do vírus influenza na população humana, incluindo a vigilância epidemiológica, características demográficas e distribuição geográfica e temporal. A análise está agrupada considerando as duas metodologias utilizadas no diagnóstico da infecção pelo vírus influenza, com vista a facilitar a sua compreensão.

A gripe sazonal constitui uma das principais causas de morbidade, mortalidade, e utilização de serviços de saúde a nível mundial, principalmente entre indivíduos com idades extremas e/ou com doenças subjacentes [77]. O diagnóstico rápido e preciso dos vírus respiratórios é essencial para a melhoria da gestão dos pacientes e para o fornecimento de informações relativas à implementação de medidas preventivas.

A identificação laboratorial dos anticorpos ou genes é exigida para um diagnóstico definitivo da influenza, o qual poderá ser utilizado como fundamento da vigilância epidemiológica. Se uma confirmação laboratorial de influenza estiver disponível precocemente durante o curso da infecção, o paciente pode beneficiar de um tratamento antiviral específico. Actualmente, diversos procedimentos de identificação do vírus influenza estão disponíveis e entre a grande diversidade de técnicas possíveis de serem aplicadas, duas técnicas foram usadas: o ensaio imunoenzimático indirecto (*ELISA*) para detecção da infecção pelos vírus influenza A e/ou B e a reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (*RT-PCR*) para a detecção do vírus pandémico A (H1N1) 2009.

5.1. Infecção pelo vírus influenza A e B

Segundo Broberg *et al.*, [78] a serologia consiste na identificação de anticorpos no soro dos pacientes, sendo amplamente utilizada para estimar a verdadeira incidência ou prevalência de um agente patogénico por exposição/infecção de um indivíduo, população ou grupo.

A influenza continua a ser a maior causa de morbimortalidade verificada globalmente, com grandes segmentos da população infectada anualmente [78] e, portanto, existem razões importantes para reunir dados seroepidemiológicos sobre esta doença. As verdadeiras taxas de infecção só podem ser estimadas a partir de análises retrospectivas de amostras serológicas da população em geral. Estas amostras revelam a diversidade de exposições a diferentes estirpes circulantes dos vírus, além da existência de uma reactividade cruzada. Os dados serológicos podem esclarecer sobre a taxa de

infecção assintomática quando acompanhados pelos dados clínicos. Finalmente, os estudos serológicos podem fornecer informações sobre a eficácia das vacinas se as estirpes vacinais não coincidirem com as estirpes circulantes, permitindo que a resposta à vacina seja diferenciada da infecção. Uma das maiores vantagens dos estudos serológicos modernos consiste em distinguir entre uma infecção natural e a imunização e ajudar na modelação das épocas de gripe e futuras pandemias [78]. Os estudos serológicos apresentam várias limitações. Uma das limitações dos estudos serológicos é a heterogeneidade das amostragens populacionais, sendo que, por exemplo, os estudos pioneiros não referem dados sobre a população pediátrica. Outra restrição é a variabilidade dos ensaios serológicos quando se comparam resultados de diferentes laboratórios [79]. Esta situação é justificada, por exemplo, pelas diferenças nos protocolos e métodos de análise aplicados [79]. Embora existam resultados publicados que demonstram como a comparabilidade dos ensaios serológicos pode ser melhorada através do uso de padrões de anticorpos. E, alguns projectos utilizam a partilha de padrões internacionais nos testes serológicos [79]. Muitos estudos serológicos baseiam-se na utilização de amostras provenientes de bancos de soro, uma vez que estas são facilmente acessíveis e, na maioria dos casos, não requerem consentimento para serem usadas. Todavia, todos os estudos publicados usam soros de referência, estirpes virais e/ou valores de *cut-off* para determinação de casos positivos ligeiramente diferentes entre si [78].

Uma diversidade de testes serológicos para o diagnóstico de influenza estão disponíveis, entre eles o teste de fixação do complemento (CF), o teste de inibição da hemaglutinação (HI), a hemólise radial simples (SRH), o teste de neutralização (N), a imunoflorescência (IF), e os ensaios imunoenzimáticos EIA e ELISA [80]. Porém, a maior parte destes testes são laboriosos, difíceis de incorporar em procedimentos automáticos e requerem uma fonte prontamente disponível de eritrócitos apropriados. A detecção de anticorpos específicos no soro através de ELISA é mais sensível que, por exemplo, os ensaios HI e CF [81], razão pela qual é mais adequado para a determinação da prevalência de anticorpos contra o vírus influenza A e B.

Os antigénios da matriz e nucleoproteína usados nos testes ELISA são altamente conservados dentro de ambos os vírus influenza A e B [81] o que permite detectar os anticorpos induzidos pelos vírus circulantes, durante os últimos anos sem requerer um ensaio específico para o subtipo. Além disso, os testes ELISA não requerem o reajuste anual dos antigénios virais. Esta técnica-padrão para a confirmação laboratorial da influenza requer, idealmente, um soro do paciente na fase aguda (colhido o mais breve

possível após o início da doença) e outro na fase convalescente (colectado 10 a 14 dias após os primeiros sintomas). A necessidade de uma segunda amostragem de sangue do paciente limita a utilidade do método [82]. Outra restrição consiste na impossibilidade de calibração e validação dos resultados quantitativos na ausência de um padrão internacional [81]. Uma vez que a praticabilidade dos vários testes ELISA para a medição dos anticorpos IgG e IgM disponíveis comercialmente é variável e por vezes inadequada. Além disso, discrepâncias consideráveis entre os resultados obtidos com diferentes testes tornam indispensável a realização de uma melhor padronização dos dados obtidos. Deste modo, no presente estudo, as concentrações das imunoglobulinas IgG e IgM contra os vírus influenza A e B foram determinadas como unidades arbitrárias VIROTECH (VE).

Assim, os resultados obtidos indicam que o vírus influenza A apresenta maior representatividade na RAM, o que poderá ser justificado pela ocorrência de uma pandemia durante o período em estudo. Durante a ocorrência de surtos gripais, o vírus da influenza A pode ser identificado com maior frequência em relação aos demais vírus respiratórios [83]. A menor prevalência do vírus influenza B, é explicada por se tratar de uma estirpe de mutação mais lenta, e por ter o Homem como único hospedeiro [84]. Estes resultados demonstram que 13,1% (IAV) e 9,6% (IBV) da população estudada apresenta concentrações positivas da imunoglobulina IgM. Estes valores referem-se aos indivíduos em fase aguda da infecção está, e portanto, os primeiros anticorpos a serem detectados são os IgM, por serem produzidos nas fases iniciais da infecção, desencadeando uma resposta imune primária [85]. Geralmente, estes anticorpos – também designados anticorpos precoces - aparecem em torno de 5 dias após o contacto com o antigénio, desaparecendo após algumas semanas ou meses. A presença de anticorpos IgM pode indicar infecção, contudo não é suficiente para o diagnóstico, razão pela qual também foram determinadas as concentrações da imunoglobulina IgG, de modo a tornar o diagnóstico mais seguro, através da avaliação da proporção de ambos os anticorpos.

Este é o primeiro estudo do género no contexto da investigação científica na RAM e, não havendo qualquer termo de comparação disponível sobre a matéria, tornou-se difícil a análise dos resultados obtidos. Igualmente, os artigos científicos consultados apresentam dados contraditórios e lacunas informativas, situação que também dificultou a comparação dos dados.

Alguma informação pertinente da bibliografia disponível sobre a matéria foi compilada de forma perceptível (tabela 20). As técnicas aplicadas não são idênticas, à

excepção do estudo holandês, no entanto, podemos comparar os resultados percentuais de casos positivos obtidos.

Tabela 20. Referências bibliográficas com valores percentuais de casos positivos em IAV e IBV.

Referência	Local	Ano	Dimensão da amostra	Técnica	Amostra	Resultados
[84]	Brasil	2004	488	Imunoflorescência indirecta	Esfregaço nasal	25,8% positivos IAV 0,6% positivos IBV
[86]	Grécia	2000	150	ELISA por imunocaptura	Esfregaço nasal	8,7% positivos IAV 2,7% positivos IBV
[87]	USA	1999	196	Cultura viral	Aspirado nasal	22% positivos IAV 4,1% positivos IBV
[88]	Holanda	1999	77	ELISA	Soro	45% positivos IAV 35% positivos IBV
Presente estudo	Portugal (Madeira)	2012	981	ELISA	Soro	10,7% positivos IAV 8,2% positivos IBV

A diferença nos resultados obtidos relativamente aos outros trabalhos mencionados pode ser justificada, essencialmente pela natureza dos métodos laboratoriais empregues na detecção da infecção viral (Imunoflorescência indirecta, ELISA por imunocaptura e cultura viral), pelos diferentes tipos de biopsia usada (esfregaço nasal, aspirado nasal e soro) e pela dimensão da amostra.

Na RAM observou-se uma maior prevalência de casos infectados com o IAV comparativamente ao IBV - resultado que está de acordo com os estudos utilizados na comparação e poderá ser justificado pelo facto do IBV dispor de apenas um único reservatório (hospedeiro), e portanto não apresenta a variabilidade genética do IAV [53].

A análise do quociente obtido entre os valores percentuais de cada um dos vírus, permite constatar que os resultados do estudo holandês [88] são os que mais se aproximam do presente trabalho, facto que poderá dever-se à utilização da mesma metodologia e tipo de amostra. Contudo, as diferenças no número de casos positivos detectados entre os 2 estudos poderão estar relacionadas com a utilização de diferentes antigénios virais que revestem as microplacas de ELISA ou às condições climatéricas mais propícias à epidemiologia na Holanda. A primeira hipótese poderá ser reforçada pelo facto de, a par da actualização das vacinas a cada ano, também as microplacas “ELISAs Virotech Influenza” são actualizadas para os novos antigénios do patogénio actual [89]. Estas actualizações, são fundamentadas na capacidade de mutação genética do vírus, com o subsequente surgimento de subtipos de influenza anualmente [89].

5.1.1. Prevalência

Durante o período em estudo registou-se na RAM uma ocorrência de 41,4 casos com probabilidade de infecção pela influenza A por cada 100.000 habitantes e de 31,5 casos de infecção por IBV. Com o objectivo de compreender a frequência da infecção (comum ou rara) provocada por estes vírus na população madeirense efectuou-se uma análise comparativa com dados publicados, os quais apresentam resultados expressos em número de casos positivos por 100.000 habitantes [90; 91; 92; 93]. Os dados reportados não diferenciam entre IAV e IBV; assim para termo de comparação, optou-se por juntar os dados obtidos no presente estudo. Deste modo obteve-se 72,9 casos por 100.000 habitantes (41,4 com IAV e 31,5 com IBV). De acordo com a tabela 21, não obstante a diversidade de dados obtidos, verificou-se que os resultados do presente estudo se aproximam dos resultados de [90] e [93]. A justificação mais plausível para a discrepância de valores poderá residir, como referido anteriormente, nos métodos laboratoriais empregues, tipos de amostras, proveniência das amostras, tipo de estirpes circulantes nos anos em estudo, as faixas etárias estudadas, as variações sazonais e prevalência da doença na área geográfica [79].

Tabela 21. Referências bibliográficas com número de casos infectados pelo vírus influenza por 100.000 habitantes.

Referência	Local	Ano	Dimensão da amostra	Resultados (nº de casos por 100.000 habitantes)
[90]	França	2012	1446	75
[91]	Espanha	2009	*	37,67
[92]	Austrália	2002	682	18,6
[93]	Portugal	2000	329	74
Presente estudo	Madeira	2012	981	72,9

* não referido

Duas razões podem ser apontadas para a aparente semelhança entre o presente estudo e em França no impacto da doença [90]: as características antigénicas do tipo de vírus em circulação; e as características do hospedeiro e a sua capacidade de reposta à infecção [94]. Em relação aos dados obtidos por [93], a explicação mais crível, poderá dever-se, entre outros factores, à predominância dos vírus influenza do tipo B na época de gripe 2000/2001, embora ocorra a presença simultânea de vírus influenza tipo AH1 e AH3

[93]. Além da proximidade genética das populações assim como as semelhantes condições climatéricas.

De acordo com a tabela 14 cerca de 4,4% e 5,8% da população infectada por IAV e IBV, respectivamente, adquiriu a infecção pela primeira vez. Esta ilação é fundamentada pelo indicador de infecção recente - IgG negativa e IgM positiva - demonstrando que o indivíduo contactou pela primeira vez com o vírus [95]. Durante a primeira infecção pelo vírus - primo-infecção - para a qual o organismo não tem qualquer aptidão imunológica, os níveis séricos dos anticorpos descrevem uma curva ascendente, aumentando de forma mais ou menos acelerada [95], conforme a figura 32.

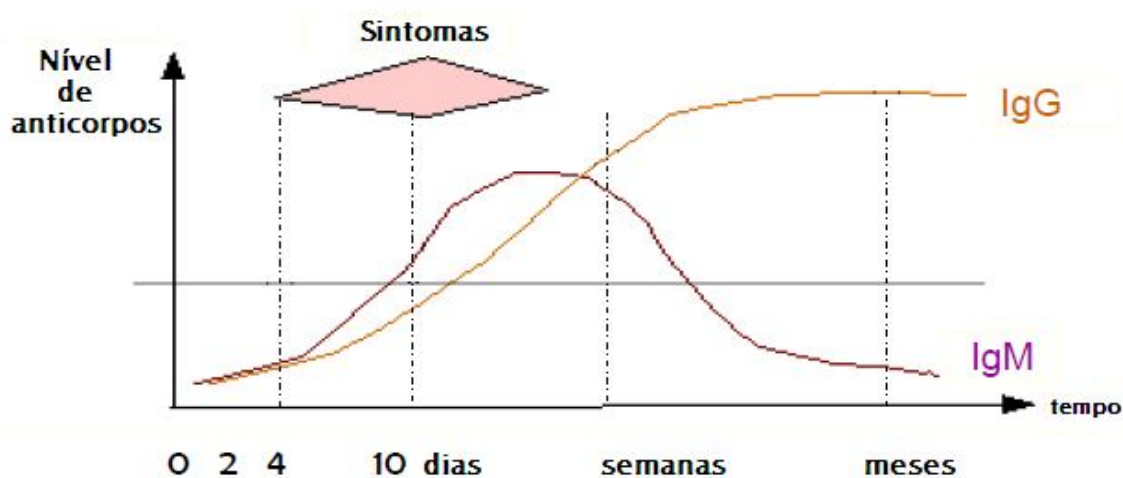


Figura 32. Resposta imune ao vírus com produção das imunoglobulinas IgM e IgG [96].

A primo-infecção estimula a produção de imunoglobulinas M, detectáveis a partir do quarto dia após o início dos sintomas, atingindo os níveis mais elevados por volta do sétimo ou oitavo dia e declinando lentamente, tornando-se indetectáveis após alguns meses. Relativamente às imunoglobulinas IgG estas são detectadas a níveis baixos e a partir do quarto dia, elevam-se gradualmente até atingirem valores mais elevados duas semanas após o início da infecção (quando a IgM já desceu para um valor quase negativo), mantendo-se detectáveis por vários anos, conferindo imunidade contra o vírus, provavelmente durante toda a vida do indivíduo [95]. A maioria dos doentes recorre ao auxílio médico quando o decréscimo dos valores de IgM já ocorreu, sendo muitas vezes negativos, e perante valores aumentados de IgG [95].

Frequentemente, a interpretação da resposta imunológica do hospedeiro é muito complicada, não permitindo um diagnóstico definitivo da infecção, uma vez que na maioria dos casos não é possível diferenciar uma infecção recente de uma infecção antiga

[95]. O diagnóstico da re-infecção para ser realizado é necessário comparar os resultados com um valor anterior, a fim de constatar a eventual subida em quatro vezes na concentração de IgG, ou seja, quando um indivíduo apresenta sintomatologia, e não temos disponível dados anteriores, o diagnóstico da doença é difícil, se não mesmo, impossível. Normalmente é difícil discernir se se trata realmente de uma re-infecção, visto que o doente mantém as IgGs toda a vida, indicando contacto com o vírus [95].

5.1.2. Características demográficas

5.1.2.1. Estrutura etária

Os vírus influenza são passíveis de causar epidemias anuais recorrentes e menos frequentemente pandemias, atingindo todos os grupos etários num curto espaço de tempo [53] e ao contrário da maioria dos vírus, podem causar infecções recorrentes. Nos EUA, o vírus influenza causa cerca de 36 mil mortes e estima-se que, seja responsável, em média, por 200 mil hospitalizações/ano [97], sendo as maiores taxas de infecção observadas nos grupos populacionais considerados de risco (idosos com mais de 65 anos, crianças menores de 5 anos, portadores de doenças crónicas ou imunodeprimidos) [60]. Aumentos significativos nas taxas de hospitalizações associadas à gripe são registados entre as pessoas com idade superior a 65 anos e inferior a 5 anos [60]. Acrescente-se que, os indivíduos com idades entre os 5 e 49 anos apresentam as taxas de hospitalizações mais baixas associadas à influenza. Neste contexto, complementa-se que, de modo similar a [60], também num estudo realizado em Portugal foi registado um aumento exponencial das taxas de mortalidade derivadas do vírus nos grupos etários acima dos 55 anos de idade [98]. Em Portugal são atribuídas à gripe sazonal, em cada época gripal, 1000 a 2000 mortes [99] sobretudo em idosos e doentes crónicos. Cerca de 5 a 15% da população portuguesa contrai a doença todos os anos [99]. No presente estudo, as maiores taxas de prevalência de infecção provocada pelo vírus influenza foram verificadas nas faixas etárias extremas, ou seja, dos 0 aos 14 anos e nos indivíduos com idade superior a 65 anos - resultado que está em concordância com estudos análogos [62; 98].

Num trabalho realizado por Simonsen *et al.*, [100] foram estudadas 26 épocas de gripe, tendo-se verificado que cerca de 57% das hospitalizações devidas a pneumonia e influenza ocorrem entre os indivíduos com idade superior a 65 anos, situação corroborada pelo facto de, crianças com idade inferior a 1 ano, adultos com idade superior a 65 anos, mulheres grávidas, e pessoas de qualquer idade com doenças co-mórbidas constituírem grupos de risco [97]. Numa revisão realizada por Nguyen-Van-Tam e Hampson [101]

constatou-se que durante os períodos inter-pandêmicos, as complicações e as mortes relacionadas com a influenza incidem especialmente sobre os indivíduos que sofrem de doenças crônicas que são principalmente, mas não exclusivamente idosas. Ainda segundo este autor, os casos mais extremos de gripe, incluindo a morbimortalidade, quando ocorrem na infância, incide em especial em crianças com menos de 3 anos de idade. A taxa de recém-nascidos hospitalizados com menos de 1 ano é semelhante à verificada nos adultos de risco elevado [101]. Num estudo realizado em Portugal que incidiu sobre a época de gripe 2008/2009, estimou-se que 82% das mortes causadas pela influenza ocorreram em indivíduos com idade igual ou superior a 75 anos [102]. De acordo com Rothberg *et al.*, [97] a taxa de mortalidade em pessoas com mais de 85 anos é 16 vezes superior comparativamente à verificada em indivíduos com idades entre os 65 e 69 anos. Estes dados são corroborados pelas taxas de hospitalização associadas à influenza que aumentam dramaticamente com a idade [60]. Segundo o mesmo trabalho, o período médio de hospitalização aumenta entre 6 dias (pacientes de 50-64 anos de idade) a 8 dias (pacientes de idade > 75 anos) [60]. Conforme assumido por Rothberg *et al.*, [97], os indivíduos dos grupos de elevado risco com idades entre os 45 e os 64 anos têm risco equivalente aos indivíduos com mais de 65 anos.

Num estudo sobre a epidemiologia das pandemias de influenza foi reportado que a maioria das mortes provocadas pela gripe ocorreu entre os indivíduos idosos, mas o aumento relativo de mortes é superior entre os jovens adultos [101]. Ainda, segundo os mesmos autores e de acordo com evidências serológicas, muitos idosos estão potencialmente protegidos durante as pandemias, uma vez que, poderão ter sido expostos, em fases anteriores da sua vida, a antigénios semelhantes, adquirindo desta forma imunidade parcial contra o vírus [101].

No presente estudo, a maior seroprevalência de indivíduos com infecção provocada pelo vírus influenza A e B foi observada na população idosa, chegando a alcançar valores de 20,3% para o IAV e 12,7% para o IBV. Os resultados obtidos corroboram as evidências de outros autores, as quais demonstram que a população mais idosa tem taxas mais elevadas de infecção por influenza [62; 97; 100]. A justificação mais plausível poderá estar relacionada com o rápido envelhecimento da população [97] e respectivas complicações inerentes, tais como doenças crônicas associadas e subsequente aumento do período de recuperação. Outra explicação foi adiantada por Thompson *et al.*, [60], e inclui a predominância de um vírus (H3N2) ao longo de várias épocas de gripe.

De acordo com Forleo-Neto *et al.*, [53], o impacto das epidemias de influenza é resultado da interacção entre a variação antigénica viral, o nível de protecção da população para as estirpes circulantes e o grau de virulência dos vírus. Segundo um estudo realizado no Brasil, cerca de 36% da população com mais de 60 anos de idade apresentou casos positivos para o vírus influenza A. Segundo o autor, esta situação poderá ter ocorrido 1) em virtude da vacina não ter sido administrada ou administrada após infecção pelo vírus, 2) devido ao sistema imunológico ter-se mostrado comprometido pela idade ou ainda, 3) pela existência de uma nova estirpe circulante [84].

O vírus influenza é, também, uma das principais causas de problemas do tracto respiratório em recém-nascidos e crianças. De facto, as crianças desempenham um papel importante na introdução e disseminação do vírus influenza nas famílias e na comunidade. De acordo com Munoz [103], os casos de gripe em crianças em idade escolar têm normalmente um pico na fase inicial de uma epidemia, sendo substituídos por casos registados em crianças e adultos. Durante as epidemias anuais, a influenza é o vírus mais frequentemente isolado em crianças, requerendo para tal atenção médica e hospitalização [103]. Na revisão bibliográfica realizada por Munoz [103], as informações disponibilizadas têm consistentemente demonstrado que as crianças com menos de 5 anos de idade, e em particular com menos de 12 meses, apresentam um risco acrescido de hospitalização devido à infecção por influenza quando comparadas com crianças mais velhas. O risco de hospitalização associado à influenza em crianças no primeiro ano de vida é tão elevado como em pessoas idosas, sendo superior ao risco estimado para adultos entre os 50 e 64 anos de idade, ou seja grupos para quem a imunização anual contra influenza é recomendada.

Segundo a bibliografia consultada constata-se que, as mortes atribuídas ao vírus influenza são muito menos comuns em crianças do que em pessoas idosas [103], uma vez que o risco de mortalidade por influenza é mais elevado entre adultos com mais de 65 anos de idade. Este grupo etário conta com mais de 57% de mortes atribuídas à pneumonia e influenza [100]. Nas crianças, as fatalidades estão, geralmente, subjacentes à pneumonia severa [103].

De acordo com Glezen *et al.*, [104] as crianças com complicações médicas, apresentam taxas de hospitalização por doença relacionada com influenza, 2 a 6 vezes superiores às crianças saudáveis. Neste contexto, acrescente-se que as condições subjacentes mais comuns em crianças com complicações por influenza são asma e doença cardíaca congénita [103].

A maior taxa de prevalência da infecção por influenza na RAM foi observada nos indivíduos com idade ≥ 65 anos, seguindo-se a faixa etária dos 0 aos 14 anos. Num estudo de revisão baseado em 22 épocas de gripe (desde 1979/1980 a 2000/2001), verificou-se que a maior taxa de hospitalizações – seguida à registada para a população idosa - associadas à influenza ocorreu em jovens crianças [60]. Noutro estudo, porém, observou-se um predomínio de casos positivos na faixa etária dos 5 aos 14 anos [84]. Conforme reconhecido por Munoz [103], a imaturidade do sistema imunológico da criança, a ausência de imunidade prévia e a exposição ao vírus contribuem potencialmente para o facto dos recém-nascidos e jovens crianças terem as taxas de infecção e hospitalização pelo vírus influenza mais elevadas em pediatria. A incidência de infecções pelo vírus influenza em crianças em idade escolar é elevada, sendo a taxa anual de infecções estimada entre 15 a 42% [103]. Na RAM, os valores percentuais registados em crianças dos 0 aos 14 anos foram de 13% para o IAV e de 10,5% para o IBV. Uma das questões levantadas por Munoz [103], refere-se à imaturidade do sistema imunológico e/ou ausência de imunidade prévia da criança. De facto, a maioria das infecções por influenza em crianças menores de 1 ano de idade ocorre, durante o segundo semestre de vida [103], uma vez que os anticorpos derivados maternalmente conferem protecção contra a influenza nos primeiros 6 meses após o nascimento. O grau e a duração da protecção está directamente dependente do histórico imunológico da mãe, destacando-se a exposição prévia à estirpe viral da influenza circulante ou a uma estirpe antigenicamente similar e a quantidade de anticorpos específicos transferidos ao bebé. Interessa referir que, num estudo realizado por Puck *et al.*, [105], confirmou-se existir uma associação directa entre o nível de anticorpos presentes no cordão umbilical e a idade da primeira infecção por influenza. O transporte placentário de anticorpos contra a influenza das mães para os filhos é um processo activo bem documentado que resulta numa maior concentração de anticorpos do lado fetal da circulação [81; 103; 105]. Os resultados obtidos em estudos similares permitem concluir que a transferência placentária activa ocorre durante o terceiro trimestre de gravidez [81]. Conforme documentado por Munoz [103], a duração dos anticorpos adquiridos passivamente pelos bebés depende da sua concentração inicial no cordão umbilical, conferindo imunidade ao bebé por um período inferior (ou igual) a 6 meses. Esta questão da imunidade passiva é importante uma vez que, as actuais vacinas disponíveis contra o vírus influenza não são indicadas para recém-nascidos com idade inferior a 6 meses [81].

De acordo com Evans [106], a imunidade insuficiente observada após o parto é um estado natural no nascimento e é conhecida clinicamente como imunodeficiência

fisiológica no recém-nascido. O sistema imunológico requer vários anos antes de chegar a um estado de maturação total nas crianças. O processo de maturação do sistema imunológico ocorre em fases iniciais de desenvolvimento do feto, antes do nascimento e a sua conclusão é atingida entre os 10 e 14 anos de idade.

Da análise dos resultados obtidos para a RAM, verificou-se um incremento das concentrações positivas dos anticorpos IgM contra IAV com a idade (0-3 meses: 1,5%; 3-6 meses: 9,1% e 6-11 meses: 14,3%), – situação que é corroborada pelos resultados dos trabalhos citados [81, 103, 106].

A mesma analogia pode ser feita em relação ao anticorpo IgG, cujas concentrações positivas de IgG decresceram com a idade das crianças (0-3 meses: 9,5%; 3-6 meses: 8,3% e 6-11 meses: 2,9%). Resultados que estão de acordo a bibliografia consultada [81, 103, 106]. Esta conclusão é reforçada por Evans [106], o qual constata que a criança antes de nascer é capaz de produzir uma pequena quantidade de anticorpos, geralmente IgM. No terceiro trimestre da gravidez, a mãe fornece todas as imunoglobulinas IgG que a criança terá no nascimento. O anticorpo IgG atravessa a placenta, conferindo imunidade até cerca de 4 a 6 meses após o nascimento da criança. Os bebés que nascem prematuramente têm baixos níveis de imunoglobulinas, justificado pela menor concentração de IgG transplacentária recebida durante o período de gravidez. Entre os quatro e seis meses de idade, a quantidade de anticorpos da mãe no recém-nascido cai para os níveis mais baixos e as IgG da criança começam a aumentar lentamente ao longo dos primeiros anos de vida. Assim, os níveis de IgM e de IgG são atingidos, respectivamente, por volta de 1 ano e dos 5-6 anos de idade [106].

5.1.2.2. Estrutura sexual

Embora o sexo e o género estejam associados à vulnerabilidade das pessoas em relação a determinado número de doenças infecciosas, o impacto do sexo e do género na exposição, susceptibilidade e respostas imunológicas a infecções agudas ainda não foi explorado de forma abrangente [107].

A influenza é reconhecida mundialmente pelo seu carácter infeccioso, surtindo impacto na saúde pública através de epidemias sazonais, pandemias e surtos localizados. As taxas de incidência, gravidade e letalidade após a infecção pelo vírus nos homens e nas mulheres, mas depende muitas vezes da idade e variam de país para país [107]. A avaliação da morbimortalidade da gripe sazonal, surtos e pandemias anteriores revela que o resultado da infecção é geralmente pior no sexo feminino, mas a magnitude dessa diferença varia de acordo com as regiões geográficas [107].

No presente estudo, registou-se uma prevalência de casos positivos nas infecções provocadas pelo IAV de 13,1% e 8,7% para os sexos feminino e masculino, respectivamente. No IBV, a maior percentagem foi igualmente registada no sexo feminino (9,7%) contra os 6,8% verificados nos homens – situação corroborada por alguns autores [84; 107]. Segundo o valor p do teste de independência Qui-quadrado de Pearson podemos afirmar que existem diferenças significativas entre os sexos e a contracção da doença para o IAV ($p=0,027$); sendo assim é mais provável uma mulher contrair infecção por IAV que um homem. Relativamente ao IBV, o teste de independência não permitiu aferir que as mulheres têm maior probabilidade de contrair a doença ($p=0,069$). Os dados disponíveis sobre a discrepância da incidência de influenza entre sexos são limitados e, por conseguinte, não havendo qualquer termo de comparação, dificultou a análise dos resultados obtidos. Segundo a OMS, e atendendo aos dados sobre a infecção pelo vírus influenza aviário H5N1, constata-se que 36% e 68% dos casos confirmados laboratorialmente na Tailândia e Egipto, respectivamente dizem respeito a mulheres [107]. De acordo com este estudo, os casos de infecção por H5N1 ocorreram igualmente entre homens e mulheres, embora fossem observadas diferenças significativas em diferentes países [107]. Porém, as taxas de hospitalização provocadas pela influenza são consistentemente maiores nos homens do que nas mulheres em todas as idades [107]. Num estudo realizado na Dinamarca, sugeriu-se que o risco de hospitalização entre homens e mulheres é alterado durante a puberdade, de forma que, os homens são mais susceptíveis a serem hospitalizados antes da puberdade, enquanto as mulheres são mais propensas a serem hospitalizadas após a puberdade.

De acordo com a bibliografia, a taxa de mortalidade associada ao vírus da gripe é diferente entre homens e mulheres [107]. A mortalidade pelo vírus da gripe sazonal é mais comum entre as crianças (menores de 5 anos) e os idosos (> 65 anos). Segundo um estudo realizado por Nogueira *et al.*, [102] em populações idosas, as taxas brutas de mortalidade são superiores no sexo feminino em Portugal (21 por 100 000 para as mulheres e 14 por 100 000 para os homens), contrariamente ao que foi registado na Suíça, onde as taxas são superiores no sexo masculino. As mulheres tendem a viver mais tempo que os homens, pelo que as taxas de mortalidade devido à gripe ajustadas à idade devem ser analisadas. Num estudo realizado nos EUA sobre a pandemia de 1957 e os dois anos epidémicos subsequentes de influenza H2N2, demonstraram que a taxa de mortalidade foi maior entre os indivíduos do sexo feminino dos 1 aos 44 anos, tendência esta que alterna para o sexo masculino a partir dos 44 anos de idade [110].

Uma análise de todos os casos de H5N1 reportados pela OMS revelou que o risco de mortalidade nas mulheres é de 1,6 vezes face aos homens [108]. Analisando os dados combinados de todos os países verificou-se que, as mulheres têm menor probabilidade de sobreviver à infecção por H5N1 que os homens [108]. Uma constatação é o facto de, por exemplo, no Egipto as mulheres serem 10 vezes mais propensas do que os homens a falecer devido ao H5N1 [108], talvez por representarem a maior parte dos indivíduos que trabalham na prestação de cuidados médicos sanitários à comunidade, e portanto, com uma maior exposição à influenza [107]. Na maioria dos países, os enfermeiros, os professores e os educadores são predominantemente do sexo feminino [111], conduzindo a um maior risco de infecção destes profissionais, pois, conforme assumido por [107], as mulheres representam mais de 50% da força de trabalho em cuidados de saúde em muitos países.

A responsabilidade pela prestação de cuidados com crianças e membros familiares doentes no domicílio também tem emergido como um importante factor de risco de exposição ao vírus da gripe [107]. De acordo com [83], as mulheres nos EUA são mais susceptíveis a desenvolver doenças respiratórias virais que os homens, independentemente da natureza da sua profissão. No entanto, as mulheres que trabalham fora de casa têm um risco menor de desenvolver uma doença viral em comparação com as mulheres que não trabalham fora de casa, sugerindo que os contextos sociais, como as creches, desempenham um papel importante na aquisição de doença viral [83].

Outro aspecto que fundamenta as diferenças observadas entre sexos diz respeito às distintas respostas imunológicas ao vírus, o que pode dever-se às diferenças genéticas e hormonais observadas entre o sexo feminino e o masculino [107; 112; 113]. Tal como demonstrado por Meier *et al.*, [112], a detecção inata do vírus por receptores de reconhecimento padrão, difere entre homens e mulheres. Outro aspecto está relacionado com os vários genes que codificam as proteínas imunológicas localizadas no cromossoma X, que se expressam mais intensamente no sexo feminino [107]. De acordo com Da Silva [113], as respostas imunes inflamatórias são também mais intensas em mulheres. As disparidades verificadas entre sexos podem ser justificadas ainda pelo efeito adverso e as respostas imunes após a vacinação contra a influenza. Da Silva [107], demonstrou que as mulheres têm percentagens de respostas dos anticorpos mais elevadas e experimentam mais frequentemente os efeitos colaterais graves. Estes dados não deveriam ser negligenciados, sendo pertinentes para a elaboração de vacinas contra a gripe.

Outra questão de grande importância diz respeito à gravidez. Uma vez que o risco de complicações decorrentes da infecção por influenza aumenta, durante o segundo e terceiro trimestre, as mudanças fisiológicas associadas à gravidez são frequentemente citadas como as principais razões para o aumento da gravidade da doença [107]. A gripe em mulheres grávidas resulta em taxas elevadas de hospitalizações quando comparadas com a população em geral ou com mulheres não gestantes da mesma idade. Conforme demonstrado por Olson *et al.*, [114], as taxas de hospitalização são 2 a 18 vezes superiores em gestantes quando comparado com mulheres não gestantes, com um aumento significativo no segundo e terceiro trimestre de gravidez. A infecção de uma mulher grávida poderá ter efeitos directos ou indirectos tanto na mãe como no feto. Note-se que, não obstante a escassez de estudos neste campo, parece haver um risco mínimo de infecção do feto por influenza a partir da infecção maternal [115]. No entanto, embora com carácter excepcional, na pandemia de H1N1 em 1918, a taxa de aborto espontâneo associado à influenza foi estimada em 26% [107]. Embora a gravidez contribua para um pior prognóstico nas mulheres, as diferenças verificadas entre sexos não podem ser dissociadas de outros factores de risco, a exemplo da asma e outras condições respiratórias crónicas, bem como a diabetes e a obesidade, as quais de acordo com a OMS [107], têm maior incidência nas mulheres.

No presente estudo, calculou-se o risco associado ao sexo e constatou-se que as mulheres têm 1,5 vezes mais probabilidade de contrair a doença do que os homens (odds ratio=1,576), situação que poderá estar relacionada com os aspectos abordados anteriormente.

5.1.3. Distribuição geográfica

As infecções provocadas pelo vírus influenza ocorrem regularmente em todo o mundo. Com o aumento da mobilidade da população mundial entre diferentes áreas geográficas é improvável que existam muitos locais que possam escapar à exposição à maioria das estirpes. O inverso também se aplica, quando uma nova estirpe com potencial epidémico surge em qualquer lugar do mundo, esta tem potencial para se disseminar globalmente de forma rápida [116].

A maior incidência do vírus influenza ocorre durante o inverno nas regiões temperadas [117]. A base desta sazonalidade acentuada não é compreendida, e inadvertidamente, não está documentado o seu modo de transmissão. Conforme um estudo realizado por Shaman e Kohn [117], a humidade relativa do ar afecta tanto a transmissão do vírus como a sua sobrevivência. Este estudo sugere, ainda que, a

humidificação do ar interior, particularmente em espaços, onde se encontram indivíduos com risco acrescido de infecção por influenza, tais como casas de repouso e salas de emergência, mitiga a propagação do vírus durante a época de gripe [117].

Tal como verificado num estudo realizado pela Rede Sentinela no Peru [118], nas terras altas do sul, os dias de sol e o tempo seco são características do outono e primavera. Mas é durante a temporada de inverno quando as temperaturas caem para 3 a -5°C que ocorre um maior número de casos de influenza A e B. Segundo estes autores, constatou-se que na costa Norte e na selva, onde a humidade alta e o calor são características todo o ano, a transmissão do vírus influenza é contínua ao longo do ano [118].

No presente estudo, verificou-se que os concelhos de Santana (29,41%), São Vicente (18,75%) e Machico (16,92%) foram os que apresentaram maior percentagem de casos com aumento significativo da concentração de anticorpos. Estes concelhos com as temperaturas médias anuais do ar mais baixas foram os que manifestaram maior número de indivíduos infectados com o IAV. Esta constatação é suportada pelo facto do clima mais frio do inverno criar condições favoráveis para a transmissão da influenza, que consegue permanecer por mais tempo no ar e percorrer distâncias maiores na forma de bioaerossol (p.e., através de excreções nasais e/ou salivares), aumentando probabilidade de infecção.

Um estudo análogo realizado em Portugal, que incidiu sobre a época de gripe de 2006/2007, apresenta uma projecção geográfica dos casos de síndrome gripal revelando que, no período em análise, a gripe disseminou-se de norte para o centro-sul [119], mas devido a insuficiência de informação estatística da região Sul (poucos participantes), não lhes foi possível concluir se o sentido da propagação se manteve entre o centro-sul e o sul, sendo, porém, de considerar este o cenário mais provável [119]. No presente estudo verificou-se que, o concelho do Funchal (49,03%) é o concelho com o maior número de pedidos para diagnóstico do vírus influenza, seguido por Santa Cruz (15,8%) e Câmara de Lobos (15,09%). Esta incidência deve-se ao facto do Funchal e as zonas urbanas limítrofes serem as zonas de maior densidade populacional na Madeira.

A gripe espanhola (1918 - 1919) matou 50 a 100 milhões de pessoas em menos de 2 anos e espalhou-se por quase toda a parte do mundo. A pandemia atacou tanto áreas urbanas como as rurais, desde regiões densamente povoadas até lugares remotos. Um estudo epidemiológico realizado nos EUA, sugeriu que esta pandemia causou mortalidade primeiro nas cidades da costa atlântica antes de atingir as cidades das zonas centrais e do oeste dos EUA [120]. Uma recolha limitada de testemunhos e relatos de surtos, contudo, levou ao consenso de que a pandemia emergiu na Primavera de 1918, numa região rural

isolada da zona central dos EUA. Esta visão tornou-se amplamente aceite [120], todavia sem uma reavaliação rigorosa da evidência original.

Pouco se sabe sobre a dinâmica comparativa da gripe nas cidades e zonas rurais em geral, principalmente devido às lacunas informativas e ausência de dados adequados. De acordo com Chowell *et al.*, [121], não existem diferenças na transmissibilidade do vírus entre as áreas urbanas e rurais. No entanto, estes autores assumem que nas áreas rurais, as maiores taxas de mortalidade foram observadas em localidades com menor aglomeração populacional [121]. Contrariamente, verificou-se que esta associação não existe nas áreas urbanas, da mesma forma não foi evidenciada nenhuma relação entre as taxas de mortalidade e a densidade populacional [121].

A maioria das pandemias de gripe está associada à recombinação genética entre as estirpes da influenza de humanos e de animais (aviários e suínos), que deriva numa nova estirpe de vírus capaz de infectar humanos, para a qual estes não dispõem de defesas. Os mecanismos de transmissão e rearranjo que originam o surgimento e desenvolvimento de novas estirpes virais de influenza A estão ilustrados na figura 33.

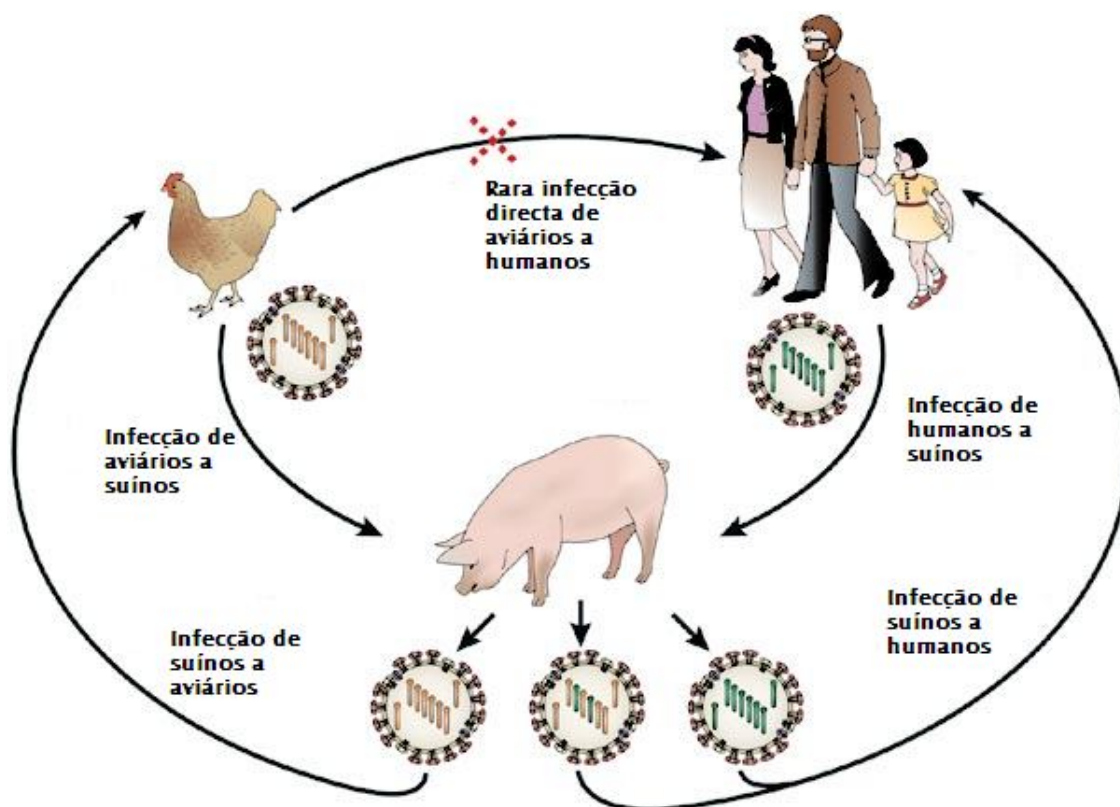


Figura 33. Mecanismos conhecidos para a emergência de novas estirpes do vírus influenza A [122].

Curiosamente, durante o surgimento de novas estirpes do vírus da gripe, somos quase sempre levados a desconfiar da China, apenas por ser a região do mundo onde esses animais são criados em condições de maior promiscuidade e falta de condições sanitárias.

5.1.4. Distribuição temporal

Como foi referido anteriormente, o vírus da gripe possui uma sazonalidade bem definida nas regiões de clima temperado, sendo a sua disseminação preponderantemente mais intensa no outono e inverno. No hemisfério Norte, a gripe tem maior impacto no inverno, durante os meses de Novembro a Abril de cada ano, porém o pico de incidência geralmente acontece entre Dezembro e Março. No hemisfério Sul, a actividade dos vírus influenza também ocorre no outono-inverno, correspondendo ao período de Maio a Outubro [56]. Apesar das observações de alguns autores citados, a razão para a sazonalidade da influenza ainda não é totalmente compreendida. De acordo com alguns estudos o clima pode influenciar directamente na sobrevivência do vírus, na eficiência da transmissão, na susceptibilidade do hospedeiro, para além de proporcionar a aglomeração da população [123].

À semelhança do que foi referido anteriormente, no presente estudo, os casos positivos com IAV observados na época 2009/2010 apresentaram maior prevalência entre os meses de Dezembro de 2009 e Fevereiro de 2010, registando-se o pico máximo em Janeiro de 2010, coincidindo com o período de maior pluviosidade atmosférica [124]. Conforme demonstrado num estudo realizado por Paget *et al.*, [125] as épocas de gripe na Europa prevalecem durante 4 a 5 meses. Esta é uma informação importante, pois destaca o facto da actividade da influenza ocorrer por um período de tempo longo no continente Europeu a cada época e realça a necessidade de dados específicos sobre cada país, com a finalidade de compreender as particularidades da actividade viral.

Vários mecanismos foram propostos para explicar esta sazonalidade, mas estão ainda longe de serem tidos como definitivos, a exemplo de determinados comportamentos humanos adoptados com maior frequência durante as épocas mais frias, como a maior aglomeração em ambientes fechados e a convivência das crianças na escola. Outra possível explicação, são as flutuações no nosso metabolismo e na resposta imune, assim como o declínio de melatonina e vitamina D no inverno [126]. Estudos focalizados nas propriedades do vírus levaram a resultados promissores. Numa análise dos dados referenciados por outros autores, notou-se que a pressão de vapor do ar, ou seja, a quantidade absoluta de água dissolvida na atmosfera exerce um efeito negativo

sobre a influenza. Assim, quanto maior a humidade absoluta, menor a transmissão e a viabilidade do vírus no ar [117]. No inverno, a temperatura atmosférica decresce, o conteúdo de água dissolvida é reduzido, pelo que o vírus sobrevive (continua infeccioso) na forma de aerossol por maior período de tempo e é transmitido com mais eficiência. Situação inversa é observada no verão, uma vez que as temperaturas atmosféricas aumentam, e subseqüentemente o conteúdo de água dissolvida no ar, inviabilizando o vírus e, em consequência, os casos de gripe decrescem [117].

No presente estudo, os casos positivos com IBV observados na época 2009/2010 tiveram maior prevalência entre os meses de Fevereiro de 2009 e Abril de 2010, registando-se o pico máximo em Março de 2010. Destes dados, aferiu-se que a maior incidência de infecção por IBV ocorre após o máximo de incidência do IAV – situação que poderá estar relacionada com o facto da actividade gripal ter sido mais precoce [127] devido ao surgimento de uma pandemia de gripe A (H1N1), durante o tempo em estudo.

5.1.5. Manifestações clínicas

A gravidade da doença durante as epidemias e pandemias de influenza é bastante variável, causando desde quadros de rinofaringite leve até pneumonia viral com complicações fatais [53]. Contudo, os sintomas mais frequentes da gripe são caracterizados pela febre, dor de cabeça, dor de garganta, congestão nasal, mialgia, anorexia e fadiga. Com menor frequência podem ser observadas náuseas, dor abdominal e diarreia [65].

No presente estudo, verificou-se que, à excepção do período compreendido entre Dezembro de 2009 e Abril de 2010, o número de indivíduos diagnosticados com gripe manteve-se abaixo dos 20 indivíduos por mês. No entanto, durante a época de gripe 2009/2010, mais concretamente no mês de Fevereiro de 2010 foi atingido um máximo de 40 casos de gripe, situação que poderá estar relacionada com a ocorrência de uma pandemia de gripe A (H1N1), durante o referido período.

Um dos sintomas sistémicos associados ao diagnóstico de gripe é o início súbito de febre ($\geq 37,8^{\circ}\text{C}$). Num estudo conduzido por Shimoni *et al.*, [128] observou-se um maior número de indivíduos com febre durante a época de gripe, do que durante o resto do ano. Segundo estes autores, em 50% dos dias, notou-se uma elevada afluência de pacientes com febre comparativamente com o resto do ano [128], sintoma indicativo de um aumento da actividade gripal. Durante os períodos inter-pandémicos, as complicações e mortes relacionadas com a influenza são mais espectáveis em indivíduos portadores de doenças subjacentes crónicas, em especial, mas não exclusivamente, idosos [101]. As

complicações clínicas incluem patologias severas como pneumonia, miocardite e pericardite. Além disso, o vírus influenza pode destabilizar doenças crónicas pré-existentes tais como a diabetes, falhas cardíacas e doença crónica obstrutiva pulmonar [101]. Efectivamente, a influenza pode ser especialmente perigosa para adultos e crianças com diabetes, os quais estão mais predispostos a padecer, e em casos mais extremos, a sucumbir devido a uma infecção por influenza. Segundo Schaffner *et al.*, [129] as pessoas com diabetes estão 6 vezes mais propensas a serem hospitalizadas com complicações associadas à influenza, e veem a probabilidade de falecer de gripe 3 vezes aumentada em relação aos indivíduos saudáveis. Além disso, cerca de 10% das mortes relacionadas com influenza e pneumonia são atribuídas à diabetes [129].

A principal ferramenta para a prevenção da influenza é a vacinação anual de indivíduos pertencentes aos grupos de risco com a vacina inactiva contra a influenza. De acordo com o Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doenças (ECDC) [130], os grupos-alvo recomendados para a vacinação anual são: a) pessoas com idade superior a 65 anos; b) residentes em lares e outros centros de cuidados; c) adultos e crianças com distúrbios crónicos no sistema pulmonar e cardiovascular; d) adultos e crianças com doenças metabólicas crónicas, disfunção renal, hemoglobopatias ou imunossupressão; e) crianças e adolescentes (6 meses-18 anos) sob risco de desenvolvimento de síndrome de Reye após terapia com aspirina; e f) mulheres no segundo ou terceiro trimestre de gestação, durante o inverno.

A eficácia da vacina contra a influenza depende principalmente da idade e imunocompetência do receptor da vacina e do grau de similaridade entre os vírus contidos na vacina e os que estão em circulação [129]. No presente estudo, não foi analisada a questão da vacinação dos indivíduos, nem a prevalência dos anticorpos após a vacinação. No entanto sabe-se que, a maioria das crianças e adultos jovens vacinados aumentam os níveis de anticorpos protectores causados pelas estirpes semelhantes àquelas que compõem a vacina. Quando a vacina e os vírus circulantes são antigenicamente similares, a vacina contra a influenza previne a doença em aproximadamente 70 a 90% dos casos com idade < 65 anos [129]. A vacinação de adultos saudáveis também tem resultado na diminuição no absentismo ao trabalho e na diminuição do uso de recursos aos serviços de saúde, incluindo o uso de antibióticos. Os indivíduos de idade avançada e/ou portadores de certas doenças crónicas podem desenvolver níveis de anticorpos pós-vacina mais baixos que os adultos jovens saudáveis e por isso, são mais susceptíveis à infecção relacionada com a influenza [129]. No entanto, a vacinação não deverá ser negligenciada, uma vez que poderá ser eficaz na

prevenção de complicações secundárias e na redução do risco de hospitalização e óbito relacionada com a gripe. Na população idosa residente em lares, a vacina pode ser 50 a 60% efectiva na prevenção da hospitalização e 80% efectiva na prevenção de óbito [129]. A administração da vacina contra a gripe sazonal é feita em todos os centros de saúde da Região Autónoma da Madeira, para os grupos de risco, nomeadamente os indivíduos com idade igual ou superior aos 65 anos, doentes crónicos ou imunodeprimidos, devidamente identificados, crianças com doença crónica ou imunodeprimidos, com seis ou mais meses de idade, devidamente identificados, grávidas com tempo de gestação superior a 12 semanas, profissionais de saúde e outros prestadores de cuidados ou apoio e pessoas com obesidade mórbida, com IMC (índice de massa corporal) acima dos 40 [131].

Actualmente, as vacinas usadas contra a influenza são inactivas, compostas por fragmentos ou subunidades proteicas virais e, portanto, incapazes de causar gripe. Após a vacinação, as reacções adversas mais frequentes ocorrem no local da aplicação da vacina e evidentes em cerca de 15% dos indivíduos vacinados. Estas reacções são autolimitadas (24-48 horas) e habitualmente não impedem o indivíduo de mover o braço ou realizar as suas actividades rotineiras [53].

Num estudo realizado em Portugal, verificou-se que, as estirpes do vírus influenza A(H3N2) e A(H1N1) isoladas durante a época de 2008/2009 demonstraram ser antigenicamente similares às estirpes introduzidas na composição da vacina para a referida época. As estirpes do vírus influenza do tipo B isoladas demonstraram ser antigenicamente diferentes da estirpe vacinal, que pertence à linhagem Yamagata (B/Florida/4/2006), sendo similares à estirpe B/Brisbane/60/08 da linhagem Victoria, estirpe proposta para integrar a vacina na época de 2009/2010 [94]. De acordo com Guiomar *et al.*, [94] na época 2008/2009, a vacina contra a gripe sazonal foi administrada em 15,2% dos casos notificados, tendo esta percentagem decrescido para 14,5% na época 2009/2010. Relativamente à administração da vacina por grupo etário, é possível verificar, que a vacina sazonal foi maioritariamente administrada aos indivíduos com 65 ou mais anos em ambas as épocas em estudo (76,2% dos casos notificados e com informação disponível em 2008/2009 e 58,6% em 2009/2010) [94].

5.2. Infecção pelo vírus pandémico A (H1N1) 2009

Embora o isolamento do vírus represente um método-padrão no diagnóstico do vírus influenza, a reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa, oferece um método alternativo que pode ser usado para a detecção rápida do genoma do vírus da gripe. A reacção em cadeia da polimerase múltipla (PCR multiplex), permite a detecção de

mais de uma sequência alvo quando incluído mais do que um par de *primers* na mistura reagente. Portanto, a PCR multiplex constitui um método menos trabalhoso e moroso, permitindo a amplificação simultânea de vários genes do vírus [132].

Embora alguns estudos façam referência a uma sensibilidade similar entre os testes com ácidos nucleicos e a cultura celular [80], outros reportam um incremento de 5 a 15% na detecção do vírus influenza usando a PCR [133]. A elevada sensibilidade e especificidade da PCR oferece muitas vantagens sobre os métodos convencionais de diagnóstico, nomeadamente na identificação dos tipos e subtipos com recurso a *primers* específicos [80]. Para identificação dos tipos A e B, a escolha dos *primers* incide nos genes internos conservados da proteína de matriz (M) ou da nucleoproteína (NP), enquanto na determinação do subtipo do vírus influenza A, procuram-se as regiões mais conservadas dos genes HA ou NA [48; 49].

No início de Abril de 2009, o Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (CDC) anunciou a identificação no México de vários surtos de síndromas semelhantes à influenza em diferentes regiões do país [134]. Mais tarde, a 24 de Abril de 2009, este organismo descreve os primeiros casos confirmados de infecção pelo vírus da gripe A (H1N1) de origem suína nos estados do Texas e Califórnia.

5.2.1. Prevalência

O novo vírus, resultante da recombinação de vírus influenza de origem suína, aviária e humana, apresentava características de uma estirpe pandémica: era transmissível pessoa a pessoa, era virulento e os humanos não possuíam imunidade para aquele vírus [135].

A disseminação geográfica ocorreu de forma excepcionalmente rápida, sendo que, entre o dia 29 de Abril e 11 de Junho de 2009, a OMS notificou 29.669 casos de infecção pela influenza A (H1N1), com confirmação laboratorial em 74 países, incluindo os 145 casos fatais [136]. Tendo em consideração a ocorrência de transmissão comunitária sustentada do novo vírus em mais do que uma região da OMS, no dia 11 de Junho de 2009, o Director-Geral da OMS declarou pandemia por vírus influenza A (H1N1) 2009 [137]. O primeiro caso de infecção pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009 em Portugal foi diagnosticado a 29 de Abril de 2009, numa mulher com ligação epidemiológica confirmada ao México (Cancun) [138]. No Arquipélago da Madeira, o primeiro caso de infecção pelo vírus foi diagnosticado a 13 de Julho de 2009, numa jovem de 15 anos, residente no Reino Unido com permanência temporária e pontual na Madeira [138]. Não foi o único caso registado, sendo que 38,6% dos 1.934 indivíduos submetidos

ao diagnóstico laboratorial do vírus da gripe estavam infectados pela gripe pandémica (H1N1) 2009.

Na Austrália, 44% dos indivíduos rastreados e provenientes da Rede Sentinela foram considerados positivos para influenza A (H1N1) 2009 nas primeiras 11 semanas após o alerta da OMS. Contudo, o valor percentual registado não foi significativamente diferente da proporção de 42% de casos positivos encontrada nas cinco épocas de gripe sazonal estudadas entre 2003 e 2007 [140]. Num estudo que incide sobre os primeiros 10.000 casos de influenza A (H1N1) na Alemanha, foi reportado que a proporção de infecções aumentou 5 valores percentuais (de 38% para 43%) entre as semanas 29 e 32 [141]. À semelhança do que é referido por estes estudos, a percentagem de casos confirmados neste estudo é similar aos casos diagnosticados noutros países. No entanto, em Portugal, durante a pandemia os doentes com sintomas sugestivos de gripe eram fortemente aconselhados a ficar em casa e a seguir as recomendações da Linha de Saúde Pública (Saúde 24), o que contribuiu para a diminuição do recurso aos serviços de saúde. Esta recomendação também contribuiu certamente para uma diminuição dos casos diagnosticados em laboratório.

5.2.2. Características demográficas

5.2.2.1. Estrutura etária

Em conformidade com outros estudos análogos, estudou-se a propensão à infecção por parte da população, e verificou-se que esta difere entre os grupos etários considerados. Dos 747 indivíduos positivos confirmados com influenza A(H1N1) 2009 na RAM, verificou-se que a infecção ocorreu em indivíduos com idades compreendidas entre os 0 e os 81 anos. A idade média dos indivíduos infectados foi de 24,6 anos. Uma característica da gripe pandémica (H1N1) A 2009 consiste no facto de esta afectar desproporcionadamente crianças e jovens adultos em comparação, com os grupos etários mais velhos [142]. Segundo Kelly e Grant [140], a idade média dos 223 pacientes com gripe pandémica na Austrália foi de 21 anos variando dos 2 aos 63 anos. Num outro estudo realizado no Reino Unido, foram confirmados 252 casos com idades compreendidas entre os 0 e os 73 anos e idade média de 20 anos [143]. Um dos primeiros estudos realizados nos EUA demonstrou que, embora a idade dos pacientes com gripe A (H1N1) 2009 estivesse entre os 3 meses e os 81 anos, cerca de 60% dos pacientes tinham idade igual ou inferior a 18 anos [8]. De facto, na maioria dos países, a maior parte dos casos com gripe A (H1N1) 2009 ocorreram nos grupos etários mais

jovens, com idade média estimada em 12-17 anos no Canadá, EUA, Chile, Japão e Reino Unido [8]. De acordo com Jain *et al.*, [144] dos 272 pacientes com infecção por gripe A (H1N1) 2009 hospitalizados nos EUA entre Abril e Junho de 2009, 45% tinha idade inferior a 18 anos, enquanto apenas 5% tinha idade igual ou superior a 65 anos. Similarmente, a idade média das 426 pessoas infectadas com o vírus da gripe A (H1N1) 2009 que estavam em quarentena nos 61 hospitais de 20 províncias da China foi de 23,4 anos [145]. As informações disponibilizadas e os resultados obtidos em estudos anteriores permitem concluir que os jovens são mais susceptíveis a contrair a gripe pandémica A (H1N1) 2009 [142; 143; 144]. Esta distribuição etária sugere a existência de uma imunidade parcial ao vírus entre a população mais idosa [146]. Esta hipótese está reforçada por estudos subsequentes que demonstraram que 33% dos indivíduos com idade superior a 60 anos apresentam anticorpos de reacção cruzada para a gripe A (H1N1) 2009, determinados através de testes de inibição da hemaglutinação e de testes de neutralização [147]. A distribuição percentual de casos positivos com influenza A (H1N1) 2009 na população madeirense por faixas etárias, permite-nos constatar que, cerca de 37,2% dos indivíduos analisados apresentam entre 20 e os 49 anos de idade, contra os 23% registados na faixa etária dos 10 aos 19 anos.

O presente estudo corrobora os resultados obtidos por Kelly e Grant [140], que demonstraram que 53% dos casos incidiram na faixa etária entre os 20 aos 49 anos de idade, sendo que 37% dos casos manifestaram-se em indivíduos com idades entre os 5 e os 19 anos. Num estudo realizado na Alemanha, a maioria dos casos (77%) foram detectados na faixa etária dos 10 aos 29 anos, enquanto 17% situaram-se entre os 30-59 anos e apenas 3% entre os 5 e os 9 anos. Estes autores reportaram uma pequena percentagem (2%) em crianças com idade inferior a 5 anos [141]. Em Portugal, nomeadamente na região centro, foram confirmados 42,7% dos casos na faixa etária dos 20 aos 29 anos, seguidos por 23,9% na faixa etária dos 10 aos 19 anos. A menor incidência, avaliada em 12,2%, foi registada entre os 0 e os 9 anos de idade [138]. Nestes estudos, não foi encontrado nenhum indivíduo com idade superior a 65 anos infectado com a gripe pandémica [140]. Segundo Gilsdorf *et al.*, [141] apenas 1% dos indivíduos tinha idade superior a 60 anos e Duque *et al.*, [138] apenas 5,5% dos casos confirmados tinham idade ≥ 50 anos. De facto, no presente estudo podemos observar valores mínimos de casos positivos a partir dos 65 anos de idade (0,4%).

Estudos recentes têm demonstrado um nível residual de imunidade na população, especialmente na população mais idosa, onde foi observado uma imunidade pré-existente para o vírus influenza A (H1N1) 2009, provavelmente como

resultado de uma exposição prévia aos vírus influenza A (H1N1) circulantes em décadas anteriores ou ao contacto com vírus influenza do tipo A durante o período de vida, de onde pode ter resultado uma imunidade heterospecífica [94].

5.2.2.2. Estrutura sexual

As taxas de incidência, gravidade e letalidade após a infecção pelo vírus influenza podem ser diferentes segundo a sexo. Curiosamente, e conforme ilustrado na tabela 22, a maioria dos casos confirmados com influenza A (H1N1) 2009 foram observados em indivíduos do sexo masculino.

Tabela 22. Referências bibliográficas com o número de casos infectados pelo vírus influenza A (H1N1) 2009 consoante o sexo.

Referência	Local	Dimensão da amostra	Número de casos (%)	
			M	F
[138]	Portugal	828	465 (56,2%)	363 (43,8%)
[140]	Austrália	223	125 (56%)	98 (44%)
[141]	Alemanha	9950	5373 (54%)	4577 (46%)
[143]	Reino Unido	252	134 (53%)	118 (47%)
Presente estudo	Madeira	747	381 (51%)	366 (49%)

Os dados disponíveis sobre o Canadá (Abril-Maio 2009) evidenciam a existência de diferenças entre ambos os sexos e respectivas idades, no que diz respeito à incidência da infecção pelo vírus A (H1N1) 2009. De acordo com a PHAC [148] a maior incidência é observada entre indivíduos do sexo masculino, quando se se tratam idades compreendidas entre os 10-19 anos. No entanto, a situação reverte-se em idades compreendidas entre os 20 e os 39 anos de idade, sendo o sexo feminino o mais afectado. A incidência da infecção é relativamente similar em ambos os sexos após os 40 anos de idade.

O presente estudo corrobora os resultados obtidos pela PHAC [148], tendo-se verificado uma maior percentagem de casos positivos em relação às mulheres até aos 19 anos e invertendo-se este cenário a partir dos 20 anos, onde o sexo feminino apresenta maior prevalência de casos positivos.

Infelizmente, muitas publicações de países como Espanha, Holanda e Tailândia, bem como revisões bibliográficas de outros países europeus, não estratificaram ou compararam a incidência de influenza A (H1N1) 2009 por sexo [107]. Nos estudos

conduzidos na Argentina, Brasil, Canadá e França, nos quais as diferenças na incidência da gripe pandémica em ambos os sexos foram estratificadas por idade, evidenciam maior infecciosidade entre mulheres adultas jovens relativamente aos homens em idades comparáveis [107].

Outra situação analisada em muitos estudos refere-se à taxa de hospitalizações. Nos primeiros casos de gripe pandémica nos EUA, foi confirmado que, na sua maioria (80,7%), dos indivíduos do sexo feminino requereram hospitalização, destacando-se 5 casos de gestantes [107]. Num estudo realizado no Canadá, dos 168 casos de pessoas infectadas com a influenza A (H1N1) 2009, a maioria eram mulheres adultas jovens (67,3%, dos quais 7,7% gestantes) [149]. Segundo estes autores, não foi possível comparar esta grande proporção de mulheres hospitalizadas com os homens. No entanto, uma justificação plausível pode estar relacionada com a existência de comorbidades, incluindo doença pulmonar crónica (por exemplo, asma) que é tipicamente mais grave no sexo feminino do que no masculino [149]. Segundo uma revisão realizada pela OMS, mais mulheres em idade reprodutiva tendem a ser mais hospitalizadas do que os homens. Além disso a manifestação da doença e a variedade de sintomas expressos na sequência da infecção pode diferir entre os sexos [107]. Apesar das complicações clínicas inerentes à gripe pandémica A (H1N1) 2009, a mortalidade não é um desfecho frequente. No entanto, na África do Sul, onde a incidência de co-infecção com VIH e tuberculose é elevada, uma taxa de mortalidade de 64,8%, foi registada em mulheres, das quais 25% eram gestantes [150]. Contrariamente, na Austrália, 58% dos casos fatais ocorreram no sexo masculino [151]. No Brasil, as taxas de fatalidade relativas à gripe pandémica foi similar entre homens e mulheres [152].

Dados bibliográficos permitem aferir que não foi evidenciado nenhum padrão consistente relativamente às diferenças sexuais no que diz respeito à mortalidade por influenza A (H1N1) 2009 [107].

Relativamente ao Arquipélago da Madeira, registaram-se 13 mortes, das quais 6 (46,2%) em indivíduos do sexo feminino, com idade média de 43,2 anos. A idade média dos indivíduos do sexo masculino infectados situou-se nos 38,1 anos. De referir ainda que, dos óbitos registados, 7 tinham patologia associada. No entanto, o primeiro indivíduo a falecer por contrair influenza A (H1N1) 2009 foi uma mulher de 52 anos sem patologia associada.

A 10 de Agosto de 2010, o Director-Geral da OMS declarou o fim da pandemia por vírus influenza A (H1N1) [153]. O número oficial de mortes devido à infecção pela gripe pandémica A (H1N1) 2009 confirmadas laboratorialmente em todo o mundo e notificadas

à OMS foi de 18,500 [153]. No entanto, crê-se que as mortes confirmadas em laboratório subestimam a mortalidade da gripe devido à falta de testes laboratoriais de rotina e às dificuldades na identificação de mortes relacionadas com a gripe.

5.2.3. Distribuição temporal

A pandemia de gripe A (H1N1), que se iniciou em 2009, entrou na Europa no dia 26 de Abril, sendo Espanha o primeiro país a registrar casos de gripe A no continente europeu [155]. Da análise da tabela 23, podemos verificar que 3 dias depois surge em Portugal, o primeiro caso de infecção pelo vírus da gripe pandémica (H1N1) 2009 [138], tornando-se no 11º país a registrar casos de gripe A no continente europeu. Só mais tardiamente, surge o primeiro caso na RAM (13 de Julho de 2009). Alguns destes casos têm ligação epidemiológica confirmada com outras proveniências, a exemplo disso, temos a Madeira, na qual o primeiro caso diagnosticado foi numa jovem de 15 anos proveniente do Reino Unido que se encontrava de passagem pela Madeira.

Tabela 23. Referências bibliográficas relativas às datas dos primeiros casos de infecção por influenza A (H1N1) 2009.

Referência	Local	Data	Link epidemiológico
[135]	Reino Unido	1 de Maio de 2009	-
[138]	Portugal	29 de Abril de 2009	Canadá
[140]	Austrália	8 de Maio de 2009	EUA
[150]	África do Sul	14 de Junho de 2009	-
[152]	Brasil	7 de Maio de 2009	América do Norte
[154]	Tailândia	12 de Maio de 2009	-
[155]	Espanha	26 de Abril de 2009	México
Presente estudo	RAM	13 de Julho de 2009	Reino Unido

A comparação dos resultados obtidos com dados bibliográficos foi impossível, uma vez que os artigos consultados são relativos a diferentes períodos de estudo. Por exemplo, Gilsdorf *et al.*, [141] reportou os primeiros 10,000 casos (Abril a Agosto de 2009), enquanto Kelly e Grant [140] apresentam dados relativos às primeiras 11 semanas de pandemia (Abril a Julho), e HPA [135] refere-se à epidemiologia do vírus entre Abril e Junho. O estudo realizado em Portugal, compreendeu um período mais abrangente, reportando-se ao período entre Outubro de 2009 a Fevereiro de 2010 [127]. Um estudo mais amplo realizado nos EUA (Connecticut) analisou os dados entre Abril de 2009 e Maio de 2010 [156]. Outro aspecto que também dificultou a análise dos resultados obtidos foi a

agregação dos casos por semanas epidemiológicas, uma vez que no presente estudo compilou-se os dados por mês.

Durante o período analisado no presente estudo, observou-se a ocorrência de dois picos distintos de influenza A (H1N1) 2009: um no Verão (Julho); e outro no Inverno (Dezembro). Esta situação é corroborada por Galvin *et al.*, [156] pois durante a epidemia de gripe A (H1N1) 2009, todos os sistemas de vigilância detectaram a ocorrência de duas ondas distintas, um pico na Primavera (Abril a Agosto) e um outro pico mais alargado no Inverno (Agosto de 2009 a Maio de 2010).

Nas regiões temperadas do Hemisfério Norte e Sul, as épocas de gripe surgem sobretudo entre Novembro e Abril e entre Maio e Outubro, respectivamente [56]. De acordo com um estudo realizado em Portugal, verificou-se, à semelhança dos resultados obtidos no presente estudo, um aumento precoce do número de casos de gripe, durante o Verão, antecipado em relação à época normal de Inverno [94]. No decorrer da época de 2009/2010 veio a revelar-se que pelas suas características clínicas e epidemiológicas, a gripe A não se afastava muito das características de uma gripe sazonal [94].

De acordo com os resultados obtidos por Prachayangprecha *et al.*, [154] o número de casos positivos aumentou desde Julho até alcançar o máximo em finais de Agosto e começou a diminuir de Setembro a Dezembro de 2009. Estes autores estudaram apenas os dados epidemiológicos compreendidos entre Julho e Dezembro de 2009, daí não ser possível verificar um possível segundo pico de casos de influenza A (H1N1) 2009. A análise destes dados seria, no entanto, interessante uma vez que sendo a Tailândia uma região tropical a epidemiologia da influenza é normalmente variável ao longo do ano.

Como mencionado anteriormente, a maioria da bibliografia consultada agregou a informação em semanas epidemiológicas, daí que, para termos uma melhor percepção dos dados obtidos, organizou-se a tabela 24 com os resultados da revisão bibliográfica.

Tabela 24. Revisão bibliográfica das semanas epidemiológicas estudadas para a infecção com o vírus influenza A (H1N1) 2009.

Referência	Local	Semana epidemiológica	Data	Pico máximo de casos positivos
[127]	Portugal	40/09 – 4/10	4 Out de 2009 - 1 Feb de 2010	Semana 48 (29 Nov a 5 Dez)
[140]	Austrália	18/09 – 28/09	3 Mai - 18 Jul 2009	Semana 25 (21 a 27 Jun)
[141]	Alemanha	17/09 – 32/09	26 Abr - 15 Ago de 2009	Semana 30 (26 Jul a 01 Ago)
[150]	África do Sul	22/09 – 41/09	31 Mai - 17 Out de 2009	Semana 32 (9 a 15 Ago)

[152]	Brasil	16/09 – 33/09	19 Abr - 22 Ago de 2009	Semana 31 (2 a 8 Ago)
[157]	Reino Unido	27/09 – 52/09	5 Jul - 27 Dez de 2009	Semana 43 (25 a 31 Out)

Da análise da bibliografia disponível, aferiu-se que o maior número de casos detectados incidiu entre Junho e Agosto [140], [141], [150] e [152]. Relativamente, aos estudos com datas mais abrangentes, verificou-se a existência da segunda onda de incidência entre a semana 43 [157] e a semana 48 [127]. Estes dados corroboram o presente estudo, nomeadamente na existência de dois picos de incidência, um em Julho e outro em Dezembro.

5.2.4. Vacinação

As vacinas são consideradas ferramentas eficazes na prevenção da gripe, não só para evitarem a propagação do vírus da gripe, mas também por diminuírem a gravidade e impacto da doença [8]. A rápida expansão da pandemia de gripe A (H1N1) 2009 em todo o mundo, motiva a necessidade da rápida implementação de uma vacina. A urgência do desenvolvimento rápido de uma vacina eficaz foi exacerbada pela capacidade do vírus ganhar propriedades de virulência adicionais, tais como patogenicidade reforçada e/ou resistência antiviral por via de mutações e/ou rearranjos com outros vírus influenza de origem aviária, suína ou humana [8]. Um estudo realizado em Portugal, referente à administração da vacina pandémica na época 2009/2010, indicou que a vacina foi administrada em apenas 2,5% dos casos notificados [94] e embora a percentagem de indivíduos vacinados contra a gripe pandémica tenha sido baixa, os dados indicam que a vacina foi maioritariamente administrada às crianças até aos 4 anos e aos idosos com 65 ou mais anos de idade (5,7% e 5,3% dos casos notificados e com informação disponível, respectivamente) [94].

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

6.1. Considerações gerais

Retirar conclusões de dados numéricos, condicionados por tantas variáveis retrospectivamente e sem informação clínica que permitisse uma avaliação clarificada dos resultados obtidos, revelou-se tarefa árdua embora algumas conclusões possam ser retiradas.

- Existem diversos métodos de diagnóstico e estes são imprescindíveis para o rápido e eficiente diagnóstico, controlo e prevenção da enfermidade causada por estes vírus. Em muitos estudos tem sido demonstrada a maior sensibilidade da PCR em relação a outras técnicas como por exemplo o ELISA.

- Conclui-se que ambos os tipos A e B do vírus influenza apresentam uma relativamente baixa imunogenicidade, o que era expectável uma vez que os anticorpos detectados só conferem imunidade relativa e temporária.

- Foi observada uma maior prevalência à infecção gripal nos grupos etários mais idosos, compatível com um grupo populacional em que a resposta imunológica se encontra debilitada e muitas vezes acompanhada por doenças sistémicas e outras complicações que contribuem para um agravamento do estado de saúde do doente.

- Foi verificada uma maior prevalência do vírus influenza A (H1N1) 2009 nos grupos etários mais jovens, compatível com a existência de uma imunidade residual na população mais idosa.

- Ficou demonstrado que as mulheres são mais susceptíveis a contrair gripe que os homens, pois também são mais propensas que os homens a serem prestadores de cuidados e a trabalhar em serviços de saúde, o que pode aumentar a sua taxa de exposição à influenza, conduzindo a um maior risco de infecção destes profissionais.

- Conclui-se da bibliografia que não existe um padrão consistente nas diferenças entre homens e mulheres na mortalidade por influenza A (H1N1) 2009.

- Observou-se uma maior prevalência dos casos positivos com IAV diagnosticados na época 2009/2010 entre os meses de Dezembro de 2009 e Fevereiro de 2010, registando-se um pico em Janeiro de 2010.

- Existem alguns mecanismos propostos para explicar a sazonalidade do vírus influenza, que vão desde, as maiores aglomerações em ambientes fechados durante o inverno, à convivência das crianças na escola, às flutuações no nosso metabolismo e na resposta imune, assim como o declínio de melatonina e vitamina D no inverno até à pressão de vapor do ar, ou seja, a quantidade absoluta de água dissolvida no ar que possui um efeito negativo sobre a influenza.

- Existem medidas de prevenção como a administração da vacina contra a gripe sazonal realizada por todos os centros de saúde da Região Autónoma da Madeira, e aplicada aos grupos de risco, nomeadamente os indivíduos com idade igual ou superior aos 65 anos, doentes crónicos ou imunodeprimidos, devidamente identificados, crianças com doença crónica ou imunodeprimidos, com seis ou mais meses de idade, devidamente identificados, grávidas com tempo de gestação superior a 12 semanas, profissionais de saúde e outros prestadores de cuidados ou apoio e pessoas com obesidade mórbida, com IMC acima dos 40, que mostram ser eficazes na diminuição dos riscos da doença.

6.2. Perspectivas futuras

A influenza continua a ser um problema considerável de saúde em todo o mundo. A OMS avalia que a cada ano ocorram 3 a 5 milhões de casos de gripe severa, resultando em 250.000-500.000 mortes em todo o mundo.

A ameaça de uma pandemia de gripe está sempre presente e as principais ferramentas para diminuir o seu impacto são os antivirais e as vacinas. O desenvolvimento da tecnologia de produção da vacina contra a gripe com vírus inactivos foi um importante avanço tecnológico. No futuro previsível é provável que a vacina principal que será implantada numa pandemia seja uma vacina inactiva cultivada em ovos embrionários de galinha, já disponível há várias décadas.

No contexto epidemiológico actual de ameaça global de uma pandemia provocada pelo vírus influenza, o controlo de possíveis surtos na espécie humana baseia-se no reforço da capacidade de vigilância virológica (a nível nacional e internacional) e na definição de casos tipo, no diagnóstico laboratorial e nas medidas de controlo da infecção. Para que este processo seja efectivo, é essencial, motivar e mobilizar os profissionais de saúde para o reforço da vigilância epidemiológica da gripe.

Um grande desafio será constituído pela necessidade de elaborar estratégias de diagnóstico durante as diferentes fases pandémicas. Estas variam entre os diferentes laboratórios de acordo com seus conhecimentos em virologia, capacidade, população,

disponibilidade de várias análises e a fase da pandemia. Nas fases precoces, os testes altamente sensíveis, tais como testes ao ácido nucleico da estirpe pandémica específica são necessários. Estes testes deverão ser rápidos para detectar e identificar os primeiros casos de infecção e *clusters* da doença, permitindo um tratamento antiviral inicial, profilaxia e controlo da infecção.

Apesar do amplo conhecimento ao nível molecular dos vírus da gripe e da disponibilidade de uma vacina eficaz, o controlo da gripe está longe de ser eficaz. Dois factores condicionam esta situação: (1) a mutabilidade antigénica do vírus influenza que requer uma reavaliação anual das estirpes a serem incluídas na vacina; e (2) a falta de aplicação anual de esforços concertados para mobilizar todos os recursos, médicos e políticos, que são necessários para um programa plenamente eficaz de profilaxia.

As populações de maior risco estão bem definidas, e os profissionais de saúde devem liderar o caminho no sentido de ter a certeza de que os níveis elevados de imunização sejam atingidos, particularmente – em ambientes que permitam reduzir a propagação da gripe nosocomial.

7. AGRADECIMENTOS

Por detrás das nossas realizações pessoais, além de um considerável esforço próprio, esconde-se normalmente um número muito grande de contribuições, apoios, sugestões, comentários ou críticas vindas de muitas pessoas. A sua importância assume no caso presente uma valia tão preciosa que, sem elas, com toda a certeza, teria sido muito difícil chegar a qualquer resultado digno de menção.

À Comissão de Ética para a Saúde do Serviço de Saúde da RAM, E.P.E., CES/SESARAM, E.P.E., pela oportunidade concebida para a execução do trabalho, pela sua receptividade e voto de confiança.

Ao Conselho Científico do Centro de Competência de Ciências Exactas, pelo parecer favorável cedido na proposta da tese a realizar numa outra instituição congénere permitindo assim, a minha mobilidade enquanto estudante.

Ao Professor Doutor Miguel Ângelo Carvalho, pela orientação séria e meticulosa, pela crítica construtiva, pela disponibilidade em todos os momentos e pela Amizade com que sempre me distinguiu. O seu exemplo afável e sábio acompanhar-me-á como uma referência pelo resto da minha Vida.

À minha orientadora externa, Doutora Paula Luísa Fernandes, a minha profunda gratidão por ter aceite orientar-me neste estudo e pela disponibilidade que sempre mostrou para entender as minhas dificuldades.

À coordenadora do Mestrado em Bioquímica Aplicada, Doutora Helena Tomás, pela dedicação e pela atenção sempre carinhosa.

À Doutora Graça Andrade, directora do Laboratório de Patologia Clínica, pelo apoio e excelentes condições de trabalho que me proporcionou e a sua colaboração prestada, sem as quais não seria possível a concretização do trabalho de mestrado.

À equipa da Secção de Serologia do Laboratório de Patologia Clínica, em particular, à Técnica de Análises Clínicas, Raquel Sanches, pela disponibilidade no auxílio nas etapas

de execução da metodologia experimental. Agradeço com amizade, os conhecimentos transmitidos e o esclarecimento de dúvidas.

Aos meus colegas de mestrado, especialmente à Dra. Cristiana Pimenta de França, pelo companheirismo e disponibilidade na leitura do trabalho e pelas sugestões pertinentes, que teceu, contribuindo para a melhoria do mesmo.

Um agradecimento especial aos meus Pais, pelo amor incondicional, pelo apoio, confiança e coragem que sempre me inculiram ao longo da vida.

Ao Carlos Gomes, ouvinte atento de algumas dúvidas, inquietações, desânimos e sucessos, pelo apoio, pela confiança e pela valorização sempre tão entusiasta do meu trabalho, dando-me, desta forma, coragem para ultrapassar a culpa pelo tempo que a cada dia lhe subtraía.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos, colegas de curso e a todos os professores que comigo partilharam do seu saber.

A todos, enfim, reitero o meu apreço e a minha eterna gratidão.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1]. Graham NMH. The epidemiology of acute respiratory infections in children and adults: A global perspective. *Epidemiol Rev* 1990; 12:149-178.
- [2]. Andrade HR. Vigilância epidemiológica da gripe em Portugal. *Rev Port Clin Geral* 2005; 21: 379-88.
- [3]. Webster RG e Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Rev Sci Tech* 2004 Aug; 23: 453-465.
- [4]. Benenson AS. *Control of Communicable Diseases Manual*. 16th ed. Washington: The American Public Health Association; 1995.
- [5]. Nascimento JP, Ferreira V e Rodrigues J. Longitudinal study of acute respiratory diseases in Rio de Janeiro occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1991; 33(4): 287-296.
- [6]. Knobler SL, Mack A, Mahmoud A, Lemon SM. *The threat of pandemic influenza: are we ready?* 1st ed. Washington: The National Academies Press; 2005.
- [7]. Mamas MA, Fraser D e Neyses L. Cardiovascular manifestations associated with influenza virus infection. *Int J Cardiol* 2008 Nov; 130(3): 304 – 309.
- [8]. Girard MP, Tam JS, Assossou OM e Kieny MP. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* 2010 Jul; 28(31): 4895-4902.
- [9]. Potter CW. A History of Influenza. *J Appl Microbiol* 2001 Jun; 91(4): 572–579.
- [10]. Jong MD e Hien TT. Avian influenza A (H5N1). *J Clin Virol* 2006 Jan; 35(1): 2-13.
- [11]. Ruiz FJG. Influenza A (H1/N1). *Rev Fac Ciênc Méd Sorocaba* 2009 Aug; 11(3): 35 – 36.
- [12]. Liu C. Influenza. In: Hoeprich PD, Jordan MC, Ronald AR. *Infectious Diseases, a treatise of infectious processes*. 5th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1994. 388-393 pp.
- [13]. Nelson MI e Holmes EC. The evolution of epidemic influenza. *Nat Rev Genet* 2007 Mar; 8: 196-205.
- [14]. Cox NJJ e Bender CA. The molecular epidemiology of influenza viruses. *Semin Virol* 1995; 6(6): 359-370.
- [15]. Zhirnov OP, Vorobjeva IV, Saphonova OA, Poyarkov SV, Ovcharenko AV, Anhlan D, et al. Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J Clin Virol* 2009 May; 45: 322–333.
- [16]. Sidorenko Y e Reichl U. Structured Model of Influenza Virus Replication in MDCK Cells. *Biotechnol Bioeng* 2004 Feb; 88(1): 1-14.

- [17]. Santos JNAD. Desenvolvimento de testes ELISA usando proteínas recombinantes de vírus influenza A e sua potencial aplicação em estratégias DIVA [dissertação]. Instituto Superior Técnico: Universidade Técnica de Lisboa; 2008.
- [18]. Lamb RA e Krug RM. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, et al. *Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. 1353-1395 pp.
- [19]. Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med* 2009; 82:153-159.
- [20]. Sieczkarski SB e Whittaker GR. Influenza virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 2002; 76(20): 10455-10464.
- [21]. Itzstein M. The war against influenza discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6: 967 – 974.
- [22]. Goto H e Kawaoka Y. A novel mechanism for the acquisition of virulence by a human influenza A virus. *PNAS* 1998; 95: 10224-10228.
- [23]. Kawaoka Y. *Influenza Virology: current topics*. Wymondham (UK): Caister Academic Press; 2006.
- [24]. Baigent SJ e McCauley JW. Influenza type A in humans, mammals and birds: determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *Bioessays* 2003 Jul; 25 (7): 657 – 671.
- [25]. Flint JS, Racaniello VR, Krug R. *Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control*. Herndon, VA: Am Soc Microbiol; 2000.
- [26]. Rappuoli R e Giudice G. *Influenza Vaccines for the Future*. 2nd ed. Siena: Springer; 2010.
- [27]. Strauss J.H. & Strauss E.G. 2008. *Viruses and human disease*. 2nd ed. New York: Academic Press; 2008.
- [28]. Perez T, Varble A, Sachidanandam R, Zlatev I, Manoharan M, García-Sastre A, et al. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *PNAS* 2010 Jun; 107(25): 11525–11530.
- [29]. Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E. NS2/NEP protein regulates transcription and replication on the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol* 2009 Jun; 90: 1398-1407.
- [30]. Nakagawa Y, Kimura N, Toyoda T, Mizumoto K, Ishihama A, Oda K, et al. The RNA Polymerase PB2 Subunit Is Not Required for Replication of the Influenza Virus Genome but Is Involved in Capped mRNA Synthesis. *J Virol* 1995 Feb; 69 (2): 728–733.
- [31]. Honda A, Mizumoto K, Ishihama A. Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. *PNAS* 2002 Oct; 99(20): 13166–13171.

- [32]. Perales B e Ortin J. The Influenza A Virus PB2 Polymerase Subunit Is Required for the Replication of Viral RNA. *J Virol* 1997 Feb; 71(2): 1381-1385.
- [33]. Lee MTM, Bishop KM, Medcalf L, Elton D, Digard P, Tiley L. Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 2002 Jan; 30(2): 429-438.
- [34]. Honda A, Mizumoto K, Ishihama A. Two separate sequences of PB2 subunit constitute the RNA cap-binding site of influenza virus RNA polymerase. *Genes Cells* 1999 Aug; 4(8): 475-485.
- [35]. Li ML, Rao P, Krug RM. The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *EMBO J* 2001 Dec; 20(8): 2078-2086.
- [36]. Fodor E, Poon LLM, Mikulasova A, Mingay LJ, Brownlee GG. Transcription of influenza A virus genes. *Int Congr Ser* 2002; (1219): 427–434.
- [37]. Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, et al. Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. *Genes Cells* 2001Feb; 6(2): 87-97.
- [38]. Baudin F, Bach C, Cusack S, Ruigrok RWH. Structure of influenza virus RNP. Influenza virus nucleoprotein melts secondary structure in panhandle RNA and exposes the bases to the solvent. *EMBO J* 1994 Jul; 13 (13): 3158 – 3165.
- [39]. Ortega J, Martín-Benito J, Zürcher T, Valpuesta JM, Carrascosa JL, Ortín J. Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* 2000 Jan; 74(1): 156-163.
- [40]. Poole E, Elton D, Medcalf L, Digard P. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology* 2004 Mar; 321: 120–133.
- [41]. Skehel JJ e Wiley DC. Influenza haemagglutinin. *Vaccine* 2002 May; 20: 551-554.
- [42]. Böttcher C, Ludwig K, Herrmann A, Heel M, Stark H. Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Lett* 1999 Dec; 463(3): 255-259.
- [43]. Sui J, Hwang WC, Perez S, Wei G, Aird D, Chen LM, et al. Structural and Functional Bases for Broad-Spectrum Neutralization of Avian and Human Influenza A Viruses. *Nat Struct Mol Biol* 2009 Mar; 16(3): 265–273.
- [44]. Murphy BR e Webster RG. Orthomyxoviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Melnick JL, et al. *Virology*, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1996. 1397 – 1445 pp.

- [45]. Compans RW e Orenstein WA. Vaccines for Pandemic Influenza. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009; 33: 228-231.
- [46]. Ohuchi M, Asaoka N, Sakai T, Ohuchi R. Roles of neuraminidase in the initial stage of influenza virus infection. *Microbes Infect* 2006 Apr; 8(5): 1287-1293.
- [47]. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk H-D. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol* 2004 Nov; 78(22): 12665-12667.
- [48]. Organização Mundial da Saúde (OMS). A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. *Bull World Health Organ* 1980 Feb; 58(4): 585-591.
- [49]. Russell RJ, Gamblin SJ, Haire LF, Stevens DJ, Xiao B, Ha Y, et al. H1 and H7 influenza haemagglutinin structures extend a structural classification of haemagglutinin subtypes. *Virology* 2004 Aug; 325(2): 287– 296.
- [50]. Fouchier RAM, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, et al. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* 2005 Mar; 79(5): 2814-2822.
- [51]. Skehel JJ. An overview of influenza haemagglutinin and neuraminidase. *Biologicals* 2009 Jun; 37(3): 177-178.
- [52]. Palese P e Shaw ML. Orthomyxoviridae, the viruses and their replication. In: Knipe DM e Howley PM. *Fields Virology*. 5th ed Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. 1647-1689 pp.
- [53]. Forleo-Neto E, Halker E, Santos VJ, Paiva TM, Toniolo-Neto J. Influenza. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003 Mar; 36(2): 267-274.
- [54]. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev* 1992 Mar ; 56(1): 152-179.
- [55]. Mizuta K, Itagaki T, Abiko C, Murata T, Takahashi T, Murayama S. Epidemics of two Victoria and Yamagata influenza B lineages in Yamagata, Japan. *Epidemiol Infect* 2004 Aug; 132 (4): 721–726.
- [56]. Barr IG, McCauley J, Cox NJ, Daniels R, Engelhardt OG, Fukuda K, et al. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine* 2010 Feb; 28(5): 1156-1167.
- [57]. Cox NJ e Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999 Oct; 354(9186):1277-82.

- [58]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Influenza (Seasonal), 2009 Apr; Influenza Fact Sheet nº 211, disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en> (acedido a 02 de Julho de 2011).
- [59]. Wallace LA, Collins TC, Douglas JDM, McIntyre S, Millar J, Carman WF. Virological surveillance of influenza-like illness in the community using PCR and serology. *J Clin Virol* 2004 Sep; 31(1): 40-45.
- [60]. Thompson WW, Shay DK, Weintraub E, Brammer L, Bridges CB, Cox NJ, et al. Influenza-Associated Hospitalizations in the United States. *J Amer Med Assoc* 2004 Sep; 292(11): 1333-1340.
- [61]. Taubenberger J e Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol-Mech* 2008; 3: 499–522.
- [62]. Subbarao K. Virulence of influenza: lessons from past outbreaks. In: Abstracts of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42: 462. San Diego: California; 2002 Sep 27-30.
- [63]. Beyer WEP, Bruijn IA, Palache AM, Westendorpt RGJ, Osterhaus ADME. The plea against annual influenza vaccination? 'The Hoskins' Paradox' revisited. *Vaccine* 1998 Dec; 16(20): 1929-1932.
- [64]. Sacramento PR. Diversidade genética da neuraminidase de vírus Influenza A, isolados de crianças internadas na cidade de São Paulo, de 1995 a 2006. [dissertação]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.
- [65]. Stambouljian D, Bonvehi PE, Nacinovich FM, Cox NJ. Influenza. *Infect Dis Clin North Am* 2000 Mar; 14 (1): 141-166.
- [66]. Organização Mundial da Saúde (OMS). WHO information for laboratory diagnosis of pandemic (H1N1) 2009 virus in humans - revised. 2009 Nov; disponível em http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO_Diagnostic_RecommendationsH1N1_20090521.pdf (acedido a 16 de Agosto de 2011).
- [67]. Goldsby RA, Kindt TJ e Osborne BA. *Kuby Immunology*. 4th ed. New York: W H Freeman; 2000. p. 162.
- [68]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Global Alert and Response (GAR) – CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1). 2009 Oct; disponível em <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/index.html> (acedido a 19 de Julho de 2011).
- [69]. BD Diagnostics – Preanalytical Systems. BD Vacutainer – Catálogo de produtos para coleta de sangue. São Paulo; 2008 Jan, disponível em www.bd.com/resource.aspx?IDX=4627 (acedido a 13 de Março de 2012).

- [70]. Despacho nº 16.548/2009, publicado no *Diário da República*, 2ª série – Nº 139, de 21 de Julho.
- [71]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Guidance on Regulations for the Transport of Infectious Substances 2009-2010 - Epidemic and Pandemic Alert and Response. 2008; disponível em www.who.int/csr/resources/publications/biosafety/WHO_HSE_EPR_2008_10.pdf (acedido a 20 de Julho 2011).
- [72]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Influenza: Recommendations for Influenza Vaccine Composition. 2009 Sep; disponível em http://www.who.int/influenza/vaccines/200902_recommendation.pdf (acedido a 13 de Março de 2012).
- [73]. Boca Scientific. Genomic DNA Isolation. Florida; 2012, disponível em <http://www.bocascientific.com/viral-genespin-virus-rnadna-isolation-kit-50-preps-p-899.html> (acedido a 17 de Julho de 2011).
- [74]. WONCA. Classificação Internacional de Cuidados Primários: ICPC-2. 2ª Edição. APMCG – Departamento editorial.1999. Lisboa.
- [75]. COMMISSION DECISION of 28 April 2008, Decision No 2008/426/EC of the European Parliament, Official Journal of the European Union. 2008 Jun; disponível em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:159:0046:0090:EN:PDF> (acedido a 17 de Agosto de 2012).
- [76]. COMMISSION DECISION of 19 March 2002, Decision No 2002/253/EC of the European Parliament, Official Journal of the European Union. 2002 Apr; disponível em <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:086:0044:0062:PT:PDF> (acedido a 17 de Agosto de 2012).
- [77]. Maltezou HS, Katerelos P, Mavrouli M, Lourida A, Routsias JG, Spanakis N, et al. Seroepidemiological study of pandemic influenza H1N1 following the 2009–2010 wave in Greece. *Vaccine* 2011 Jun; 29: 6664-6669.
- [78]. Broberg E, Nicoll A e Amato-Gauci. Seroprevalence to Influenza A(H1N1) 2009 Virus—Where Are We? *Clin Vaccine Immunol* 2011 Aug; 18(8): 1205-1212.
- [79]. Stephenson I, Heath A, Major D, Newman RW, Hoschler K, Junzi W, et al. Reproducibility of serologic assays for influenza virus A (H5N1). *Emerg Infect Dis* 2009 Aug; 15(8):1250–1259.
- [80]. Dwyer DE, Smith DW, Catton MG e Barr IG. Laboratory diagnosis of human seasonal and pandemic influenza virus infection. *Med J Australia* 2006 Nov; 185(10): S48-S53.
- [81]. Wutzler P, Schmidt-Ott R, Hoyer H e Sauerbrei A. Prevalence of influenza A and B antibodies in pregnant women and their offspring. *J Clin Virol* 2009 Oct; 46(2): 161-164.

- [82]. Stambouliau D, Bonvehi PE, Nacinovich FM e Cox N. Influenza. *Infect Dis Clin North Am* 2000 Mar; 14(1): 141-166.
- [83]. Monto AS. Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents, and interventions. *Am J Med* 1995 Dec; 99(6B): 24S-27S.
- [84]. Oliveira JF, Sá JPO e Cruz MEM. Influenza virus A and B identification and monitoring in the population of Maceió. *Ciência & Saúde Colectiva* 2004 Feb; 9(1): 241-246.
- [85]. Vikerfors T, Lindegren G, Grandien M e Van der Logt J. Diagnosis of Influenza A Virus Infections by Detection of Specific Immunoglobulins M, A, and G in Serum. *J Clin Microbiol* 1989 Mar; 27(3): 453-458.
- [86]. Plakocefalos E, Markoulatos P, Ktenas E, Spyrou N, Vamvakopoulos NC. A comparative study of immunocapture ELISA and RT-PCR for screening clinical samples from Southern Greece for human influenza virus types A and B. *J Med Microbiol* 2000 Nov; 49(11): 1037-1041.
- [87]. Noyola DE, Paredes AJ, Clark B, Demmler GJ. Evaluation of a Neuraminidase Detection Assay for the Rapid Detection of Influenza A and B Virus in Children. *Pediatr Dev Pathol* 2000 Mar-Apr; 3(2):162-167.
- [88]. Rothbarth PH, Groen J, Bohnen AM, Groot R, Osterhaus AD. Influenza virus serology – a comparative study. *J Virol Methods* 1999 Mar; 78(1-2):163-169.
- [89]. Gold Standard Diagnostics. Virotech Respiratory Panel. 2012; disponível em <http://gsdx.us/index.php/featured-products/179-virotech-respiratory-panel> (acedido a 31 de Maio de 2012).
- [90]. Inserm, Université Pierre et Marie Curie (UPMC). The Institut de Veille Sanitaire (InVS). Sentinelles network; disponível em <http://websenti.u707.jussieu.fr/sentiweb/2116.pdf> (acedido a 31 de Maio de 2012).
- [91]. Boqué MC e Rello J. Keys to managing cases of severe influenza A (H1N1)v in the emergency department. *Emergencias* 2009; 21: 370-375.
- [92]. Yohannes K, Roche P, Blumer C, Spencer J, Milton A, Bunn C, et al. Australia's notifiable diseases status, 2002: annual report of the National Notifiable Diseases Surveillance System. *Commun Dis Intell* 2004; 28:6–68.
- [93]. Pechirra P, Rebelo-de-Andrade H, Guiomar R, Ribeiro C, Coelho A, Pedro S, George F. Actividade gripal em Portugal no inverno de 2000/2001 Análise antigénica e genética das estirpes de vírus influenza. *Acta Méd Port* 2005; 18: 19-26.
- [94]. Guiomar R, Nunes B e Gonçalves P. A Gripe em Portugal nas épocas 2008/2009 e 2009/2010. Relatório do Programa Nacional de Vigilância da Gripe. Laboratório Nacional

de Referência para o Vírus da Gripe. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. Lisboa, Outubro 2010.

[95]. Faculdade de Medicina da Universidade do Porto. Virologia. Março de 2007; disponível em http://cc04-10.med.up.pt/Microdesgravadas/34_VirusDNA.pdf (acedido a 1 de Junho de 2012).

[96]. Huynen P. Serological diagnosis in 2006 and future prospects. Medical Microbiology, CHU-Liège; 27th Symposium Société belge d'infectiologie et de microbiologie clinique; disponível em <http://www.sbimc.org/2006/fall/slides/Huynen.pdf> (acedido a 2 de Junho de 2012).

[97]. Rothberg MB, Haessler SD e Brown RB. Complications of viral influenza. Am J Med 2008 Apr; 121(4): 258-264.

[98]. Nunes B, Viboud C, Machado A, Ringholz C, Rebelo-de-Andrade H, Nogueira P. Excess Mortality Associated with Influenza Epidemics in Portugal, 1980 to 2004. PLoS One. 2011 Jun; 6(6): e20661.

[99]. Direcção Geral de Saúde – Grupo Operativo da Estrutura da Gripe. Disponível em http://www.nerpor.pt/portal/newsletter/doc/14_43.pdf (acedido a 7 de Junho de 2012).

[100]. Simonsen L, Fukuda K, Schonberger LB e Cox NJ. The impact of influenza epidemics on hospitalizations. J Infect Dis 2000; 181: 831-837.

[101]. Nguyen-Van-Tam JS e Hampson AW. The epidemiology and clinical impact of pandemic influenza. Vaccine 2003 May; 21(16): 1762 – 1768.

[102]. Nogueira PJ, Nunes B, Machado A, Rodrigues E, Gómez V, Sousa L, et al. Early estimates of the excess mortality associated with the 2008-9 influenza season in Portugal. Euro Surveill 2009 May; 14(18): pii: 19194.

[103]. Munoz FM. Influenza virus infection in infancy and early childhood. Paediatr Respir Rev 2003 Jun; 4(2): 99-104.

[104]. Glezen WP, Greenberg SB, Atmar RL, Piedra PA, Couch RB. Impact of respiratory virus infections on persons with chronic underlying conditions. JAMA 2000 Jan; 283(4): 499–505.

[105]. Puck JM, Glezen WP, Frank AL, Six HR. Protection of infants from infection with influenza A virus by transplacentally acquired antibody. J Infect Dis 1980 Dec; 142(6): 844–849.

[106]. Evans N. Immature immune system and risk of infection in newborn infants. Essentials of Pediatrics 2010 May; disponível em <http://www.helium.com/items/1847365-immature-immune-system-and-risk-of-infection-in-newborn-infants> (acedido a 10 de Junho de 2012).

- [107]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Department of Gender, Women and Health. Sex, gender and influenza. 2010 Jul; disponível em http://www.who.int/gender/document/s/women_and_girls/9789241500111/en/index.html (acedido a 13 de Junho de 2012).
- [108]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Update: WHO confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infection, November 2003–May 2008. *Weekly Epidemiological Record*, 2008, 83:415–420.
- [109]. Jensen-Fangel S, Mohey R, Johnsen SP, Andersen PL, Sørensen HT, Ostergaard L. Gender differences in hospitalization rates for respiratory tract infections in Danish youth. *Scand J Infect Dis*. 2004; 36(1): 31-36.
- [110]. Serfling RE, Sherman IL, Houseworth WJ. Excess pneumonia-influenza mortality by age and sex in three major influenza A2 epidemics, United States, 1957-58, 1960 and 1963. *Am J Epidemiol* 1967 Sep; 86(2): 433–441.
- [111]. Organização Mundial da Saúde (OMS). Women and health: today's evidence tomorrow's agenda. Geneva, World Health Organization, 2009.
- [112]. Meier A, Chang JJ, Chan ES, Pollard RB, Sidhu HK, Kulkarni S, et al. Sex differences in the Toll-like receptor-mediated response of plasmacytoid dendritic cells to HIV-1. *Nat Med* 2009 Aug; 15(8): 955–959.
- [113]. Da Silva JA. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. *Ann Rheum Dis* 1995 Jan; 54(1): 6–16.
- [114]. Eickhoff TC, Sherman IL, Serfling RE. Observations on excess mortality associated with epidemic influenza. *JAMA* 1961 Jun; 176: 776–782.
- [115]. Szekeres-Bartho J. Immunological relationship between the mother and the fetus. *Int Rev Immunol* 2002 Nov-Dec; 21(6): 471–495.
- [116]. Evans AS e Kaslow RA. *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*. 4th ed. New York: Plenum Publishing Corporation; 1997.
- [117]. Shaman J e Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality. *PNAS* 2009; 106: 3243 – 3248.
- [118]. Laguna-Torres VA, Gómez J, Ocaña V, Aguilar P, Saldarriaga T, Chavez E, et al. Influenza-Like Illness Sentinel Surveillance in Peru. *PLoS ONE* 2009; 4(7): e6118.
- [119]. Fundação Calouste Gulbenkian. Instituto Gulbenkian de Ciência. Gripenet 2012. Disponível em <http://www.gripenet.pt/pt/resultados/historico/analise-20062007/> (acedido a 16 de Junho de 2012).
- [120]. Olson DR, Simonsen L, Edelson PJ e Morse SS. Epidemiological evidence of an early wave of the 1918 influenza pandemic in New York City. *PNAS* 2005 Aug; 120(31): 11059–11063.

- [121]. Chowell G, Bettencourt LMA, Johnson N, Alonso WJ e Viboud C. The 1918-1919 influenza pandemic in England and Wales: spatial patterns in transmissibility and mortality impact. *Proc R Soc B* 2008; 275: 501-509.
- [122]. Stevens J, Blixt O, Paulson JC e Wilson IA. Glycan microarray technologies: tools to survey host specificity of influenza viruses. *Nat Rev Microbiol* 2006 Nov; 4: 857-864.
- [123]. Alonso WJ, Viboud C, Simonsen L, Hirano EW, Daufenbach LZ, Miller MA. Seasonality of influenza in Brazil: a traveling wave from the Amazon to the subtropics. *Am J Epidemiol* 2007 Jun;165(12): 1434-1442.
- [124]. Instituto de Meteorologia, IP Portugal. Inverno chuvoso em Portugal. Disponível em http://www.meteo.pt/pt/media/noticias/newsdetail.html?f=/pt/media/noticias/arquivo/2010/Inverno_2009_2010.html (acedido a 17 de Junho de 2012).
- [125]. Paget WJ, Marquet R, Meijer A, van der Velden J. Influenza activity in Europe during eight seasons (1999-2007): an evaluation of the indicators used to measure activity and an assessment of the timing, length and spread across Europe. *BMC Infectious Diseases*. 2007; 7(1):141.
- [126]. Lipsitch M e Viboud C. Influenza seasonality: Lifting the fog. *PNAS* 2009 Mar; 106(10): 3645-3646.
- [127]. Correia AM, Queirós L e Dias J. Pandemia de gripe A (H1N1) no Norte de Portugal: características da onda de Outono/Inverno. *Rev Port Pneumol* 2010; 16(6): 880-886.
- [128]. Shimoni Z, Niven M, Kama N, Dusseldorp N e Froom P. Increased complaints of fever in the emergency room can identify influenza epidemics (Abstract). *Eur J Intern Med* 2008 Nov; 19(7): 494 – 498.
- [129]. Schaffner W, Rehm SJ e Elasy TA. Influenza Vaccination: An Unmet Need in Patients With Diabetes. *Clinical Diabetes* 2007; 25(4): 145-149.
- [130]. Centro Europeu de Controlo e Prevenção de Doenças (ECDC). Factsheet for citizens - Seasonal influenza. Disponível em http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/documents/0712_seasonal_human_influenza_vaccination.pdf (acedido a 19 de Junho de 2012).
- [131]. Instituto de Administração da Saúde e Assuntos Sociais, IP RAM. Campanha de vacinação contra a gripe 2011/2012 (com a vacina trivalente) – circular normativa. Disponível em http://iasaude.sras.gov-madeira.pt/Documentos/WEB/Anexos/circular_normativa_6_2011_vacinacao_gripe_2011_2012.pdf (acedido a 22 de Junho de 2012).
- [132]. Boonsuk P, Payungporn S, Chieochansin T, Samransamruajkit R, Amonsin A, Songserm T, et al. Detection of influenza virus types A and B and type A subtypes (H1, H3, and H5) by multiplex polymerase chain reaction. *Tohoku J Exp Med* 2008 May; 215: 247-255.

- [133]. Schweiger B, Zadow I, Heckler R, Timm H e Pauli G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2000 Apr; 38(4): 1552-1558.
- [134]. Outbreak of swine-origin influenza A (H1N1) virus infection – Mexico, March-April 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2009; 58:467-70. Disponível em: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm58d0430a2.htm> (acedido a 17 de Agosto de 2010).
- [135]. Health Protection Agency and Health Protection Scotland new influenza A(H1N1) investigation teams. Epidemiology of new influenza A(H1N1) in the United Kingdom, April-May 2009. *Euro Surveill.* 2009;14:pii=19213. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N19/art19213.pdf> (acedido a 17 de Agosto de 2010).
- [136]. Organização Mundial da Saúde. Global Alert and Response. Influenza A(H1N1) - update 48. Disponível em http://www.who.int/csr/don/2009_06_12/en/index.html (acedido a 22 de Junho de 2012).
- [137]. World Health Organization (WHO). Transcript of statement by Margaret Chan, Director-General of the WHO. 11 June 2009. Disponível em: www.who.int/mediacentre/influenzaAH1N1_presstranscript_20090611.pdf (acedido a 22 de Junho de 2012).
- [138]. Duque V, Cordeiro E, Mota V, Vaz J, Morais C, Rodrigues F, et al. The early days of pandemic (H1N1) 2009 virus infection in the central region of Portugal. *Rev Port Pneumol* 2010 Jul; 16(6): 870-879.
- [139]. Secretaria Regional dos Assuntos Sociais. Confirmado primeiro caso de gripe H1N1 na RAM. Disponível em: http://sras.gov-madeira.pt/index.php?option=com_content&view=article&id=813:primeiro-caso-de-gripe-h1n1-na-ram&catid=30:varios-artigos (acedido a 22 de Junho de 12).
- [140]. Kelly H e Grant K. Interim analysis of pandemic influenza (H1N1) 2009 in Australia: surveillance trends, age of infection and effectiveness of seasonal vaccination. *Euro Surveill* 2009 Aug; 14(31): pii: 19288. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19288> (acedido a 24 de Junho de 2012).
- [141]. Gilsdorf A, Poggensee G e Working Group Pandemic Influenza A(H1N1)v. Influenza A(H1N1)v in Germany: the first 10,000 cases. *Euro Surveill* 2009 Aug; 14(34): pii: 19318. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19318> (acedido a 24 de Junho de 2012).

- [142]. Kwan-Gett TS, Baer A e Duchin JS. Spring 2009 H1N1 influenza outbreak in King country Washington. *Disaster Med Public Health Prep* 2009 Dec; 3 Suppl 2:S109-16.
- [143]. Health Protection Agency; Health Protection Scotland; National Public Health Service for Wales; HPA Northern Ireland Swine influenza investigation teams. Epidemiology of new influenza A (H1N1) virus infection, United Kingdom, April-June 2009. *Euro Surveill* 2009 Jun; 14(22). pii: 19232. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19232> (acedido a 24 de Junho de 2012).
- [144]. Jain S, Kamimoto L, Bramley AM, Schmitz AM, Benoit SR, Louie J, et al. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N Engl J Med* 2009 Nov; 361(20): 1935 – 1944.
- [145]. Cao B, Li XW, Mao Y, Wang J, Lu HZ, Chen YS, et al. Clinical features of the initial cases of 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus infection in China. *N Engl J Med* 2009 Dec; 361(26): 2507–2517.
- [146]. Rothberg MB e Haessler SD. Complications of seasonal and pandemic influenza. *Crit Care Med* 2010 Apr; 38(4 Suppl):e91-7.
- [147]. Serum cross-reactive antibody response to a novel influenza A (H1N1) virus after vaccination with seasonal influenza vaccine. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2009 May; 58 (19): 521–556. Disponível em <http://www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm5819.pdf> (acedido a 25 de Junho de 2012).
- [148]. Ontario Novel H1N1 Influenza A Virus epidemiologic summary, June 4, 2009. Ottawa, Public Health Agency of Canada. Disponível em <http://www.ontla.on.ca/library/repository/mon/23006/292860.pdf> (acedido a 1 de Julho de 2012).
- [149]. Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA* 2009 Nov; 302(17): 1872–1879.
- [150]. Archer B, Cohen C, Naidoo D, Thomas J, Makunga C, Blumberg L, et al. Interim report on pandemic H1N1 influenza virus infections in South Africa, April to October 2009: epidemiology and factors associated with fatal cases. *Euro Surveill* 2009 Oct; 14(42) pii: 19369. Disponível em <http://eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N42/art19369.pdf> (acedido a 2 de Julho de 12).
- [151]. New South Wales public health network. Progression and impact of the first winter wave of the 2009 pandemic H1N1 influenza in New South Wales, Australia. *Euro Surveill* 2009 Oct; 14(42). pii: 19365. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N42/art19365.pdf> (acedido a 2 de Julho de 2012).

- [152]. Oliveira W, Carmo E, Penna G, Kuchenbecker R, Santos H, Araujo W, et al. Pandemic H1N1 influenza in Brazil: analysis of the first 34,506 notified cases of influenza-like illness with severe acute respiratory infection (SARI). *Euro Surveill* 2009 Oct; 14 (42) pii: 19362. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V14N42/art19362.pdf> (acedido a 2 de Julho de 2012).
- [153]. Organização Mundial da Saúde. Transcript of virtual press conference with Dr Margaret Chan, Director-General, World Health Organization. Disponível em http://www.who.int/mediacentre/vpc_transcript_joint_2010_08_10.pdf (acedido a 3 de Julho de 2012).
- [154]. Prachayangprecha S, Makkoch J, Payungporn S, Chieochansin T, Vuthitanachot C, Vuthitanachot V, et al. Serological Analysis of Human Pandemic Influenza (H1N1) in Thailand. *J Health Popul Nutr* 2010 Dec; 28(6): 537-544.
- [155]. Català L, Rius C, García de Olalla P, Nelson JL, Alvarez J, Minguell S, et al. Pandemic A/H1N1 influenza: Transmission of the first cases in Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2012 Feb; 30(2): 60 – 63.
- [156]. Galvin JR, Cartter ML e Sosa L. Pandemic Influenza. *Connecticut Department of Public Health. Connecticut Epidemiologist* 2010 Dec; 30(8): 29 – 32.
- [157]. Keramarou M, Cottrell S, Evans MR, Moore C, Stiff R E, Elliott C, et al. Two waves of pandemic influenza A(H1N1)2009 in Wales – the possible impact of media coverage on consultation rates, April – December 2009. *Euro Surveill* 2011 Jan; 16 (3) pii: 19772. Disponível em <http://www.eurosurveillance.org/images/dynamic/EE/V16N03/art19772.pdf> (acedido a 7 de Julho de 2012).

9. ANEXOS

9.1. Ensaio imunoenzimático indirecto (ELISA)

9.1.1. Conteúdo e composição do kit de teste de ELISA

O kit Influenza A/B IgG/IgM ELISA® da Genzyme Virotech® fornece os seguintes componentes e respectivas unidades e/ou volumes:

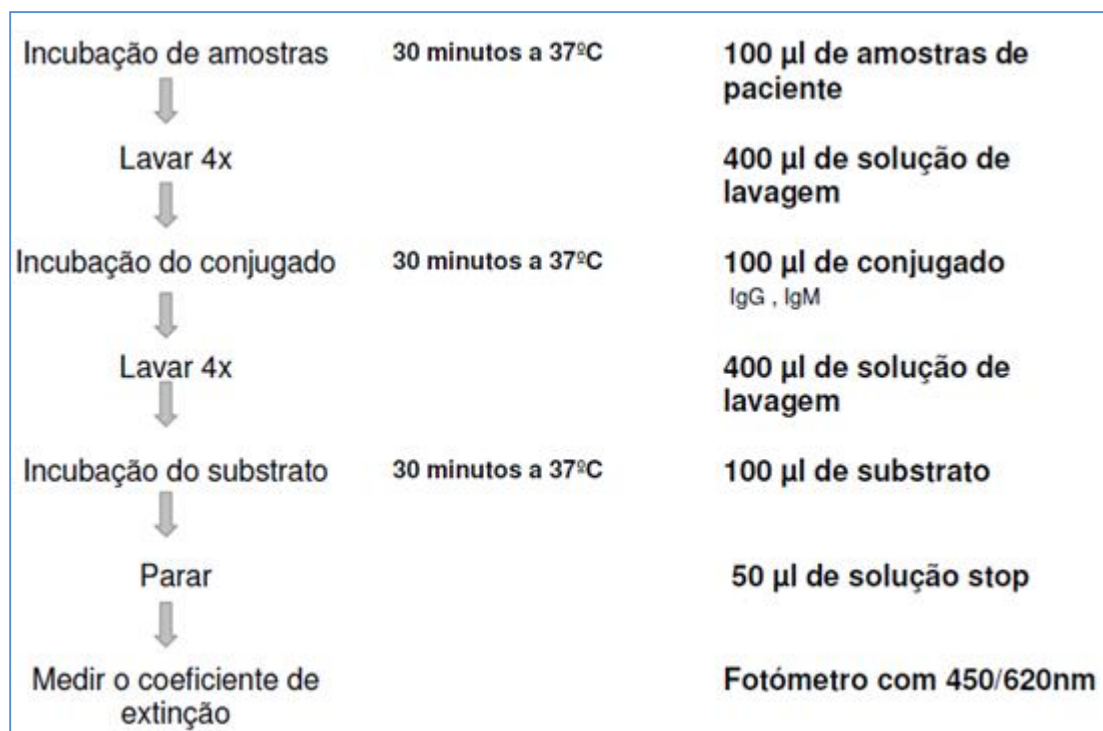
Tabela 25. Componentes do teste de ELISA e unidades/volumes correspondentes.

Componentes do teste e composição	Unidades /volume
Microplaca constituída por 96 poços individuais, separáveis, revestidos com antigénio, liofilizado.	1
Tampão de diluição PBS (azul, pronto a usar), pH 7,2 com conservantes e Tween 20	2x50 mL
Solução de lavagem PBS (20x concentrada), pH 7,2 com conservantes e Tween 20	50 mL
Controlo negativo de IgG , soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar	1300 µL
Controlo cut-off de IgG , soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar	1300 µL
Controlo positivo de IgG , soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar	1300 µL
Controlo negativo de IgM , soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar	1300 µL
Controlo cut-off de IgM , soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar	1300 µL
Controlo positivo de IgM , soro humano com estabilizadores proteicos e conservantes, pronto a usar	1300 µL
Conjugado IgG (anti-humano) , conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com estabilizadores proteicos e conservantes em tampão Tris, pronto a usar	11 mL
Conjugado IgM (anti-humano) , conjugado peroxidase de rábano (ovelha ou cabra) com FCS e conservantes em tampão Tris, pronto a usar	11 mL
Solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina), pronto a usar	11 mL
Solução stop citrato , contém uma mistura de ácidos	6 mL

9.1.2. Esquema de realização do teste influenza A/influenza B ELISA IgG/IgM

Todas as ELISAs da Genzyme Virotech® podem ser executadas com a ajuda de processadores ELISA.

Tabela 26. Fluxograma da metodologia referente às sucessivas etapas executadas no processador AP22 SPEEDY para o teste ELISA.



9.2. Reacção em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR)

9.2.1. Conteúdo e composição do kit usado para a extracção de RNA viral do vírus da gripe A pandémica (H1N1)v 2009

O kit QIAamp Viral RNA Mini Kit® da QIAGEN® fornece os seguintes componentes e respectivas unidades e/ou volumes:

Tabela 27. Componentes do kit de extracção de RNA viral do vírus da gripe A pandémica (H1N1) 2009.

Componentes do teste e composição	Unidades /volume
QIAamp Mini Colunas de extracção	50
Tubos colectores (2 mL)	200
Tampão AVL	31 mL
Tampão AW1 (concentrado)	19 mL
Tampão AW2 (concentrado)	13 mL
Tampão AVE	3 x 2 mL
RNA Carrier (poly A)	310 µg

9.2.2. Conteúdo e composição do kit usado na RT-PCR do vírus da gripe A pandémica (H1N1) 2009

O kit AgPath-ID® One Step RT-PCR da Applied Biosystems® fornece os seguintes componentes e respectivas unidades e/ou volumes:

Tabela 28. Componentes e composição do kit AgPath-ID® One Step RT-PCR (Applied Biosystems).

Componentes do teste e composição	Unidades /volume
2x RT-PCR Buffer	14 mL
25x RT-PCR Enzyme Mix	1100 µL
Água livre de nucleases	25 mL
Forward PCR primer	50 µL
Reverse PCR primer	50 µL
Sonda TaqMan	50 µL

9.3. Estatística

Tabela 29. Teste da normalidade Kolmogorov-Smimov

		IAV_IgG	IAV_IgM	IBV_IgG	IBV_IgM
N		980	965	976	961
Normal Parameters(a,b)	Mean	,8569	,6279	,6288	,372
	Std. Deviation	,85786	1,09493	,66712	,6583
Most Extreme Differences	Absolute	,182	,307	,185	,322
	Positive	,143	,307	,119	,322
	Negative	-,182	-,291	-,185	-,299
Kolmogorov-Smirnov Z		5,686	9,540	5,767	9,983
Asymp. Sig. (2-tailed)		,000	,000	,000	,000

a Test distribution is Normal

b Calculated from data.

Tabela 30. Teste do qui-quadrado de Pearson.

GrupoEtário	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IAV 1	420	244,66	102759,00
4	78	275,54	21492,00
Total	498		
Pearson Chi-Square		X = 15,595	
Asymp. Sig. (2-tailed)		,001	

Grouping Variable: GrupoEtário

Tabela 31. Teste do qui-quadrado de Pearson.

GrupoEtário	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IBV 1	419	240,43	100739,00
4	78	295,05	23014,00
Total	497		
Pearson Chi-Square		X = 11,435	
Asymp. Sig. (2-tailed)		,01	

Grouping Variable: GrupoEtário

Tabela 32. Teste do qui-quadrado de Pearson.

CatSexo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IAV 1	445	512,87	228229,00
2	520	457,43	237866,00
Total	965		
Pearson Chi-Square		X = 4,907	
Asymp. Sig. (2-tailed)		,027	

Grouping Variable: CatSexo

Tabela 33. Teste do qui-quadrado de Pearson.

	CatSexo	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IBV	1	443	506,30	224289,50
	2	518	459,37	237951,50
	Total	961		
Pearson Chi-Square			X = 3,295	
Asymp. Sig. (2-tailed)			,069	

Grouping Variable: CatSexo

Tabela 34. Teste de Mann-Whitney.

	Epocagripe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IAV	1	459	458,44	210422,50
	2	506	505,28	255672,50
	Total	965		
Mann-Whitney U			104852,5	
Wilcoxon W			210422,5	
Z			-2,608	
Asymp. Sig. (2-tailed)			,009	

Grouping Variable: Epocagripe

Tabela 35. Teste de Mann-Whitney.

	Epocagripe	N	Mean Rank	Sum of Ranks
IBV	1	458	480,32	219986,00
	2	503	481,62	242255,00
	Total	961		
Mann-Whitney U			114875,0	
Wilcoxon W			219986,0	
Z			-,073	
Asymp. Sig. (2-tailed)			,942	

Grouping Variable: Epocagripe