

Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado de Biologia Molecular em Saúde



**Infeções Respiratórias por Vírus *Influenza* na Região Autónoma  
da Madeira**

**Diagnóstico e epidemiologia da infeção por vírus pandémico 2009  
*Influenza A (H1N1)***

Tese de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em  
Saúde

Ana Filipa Fernandes Dantas

Dezembro 2017

Escola Superior de Saúde Egas Moniz

Mestrado de Biologia Molecular em Saúde



**Infeções Respiratórias por Vírus *Influenza* na Região Autónoma  
da Madeira**

**Diagnóstico e epidemiologia da infeção por vírus pandémico 2009  
*Influenza A (H1N1)***

Tese de dissertação para obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular em  
Saúde

Ana Filipa Fernandes Dantas

Orientador: Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira

Dezembro 2017

*“You are never alone or helpless. The force that guides the stars,  
guides you too.”*

Shrii Shrii Anandamurti

## **Agradecimentos**

... e foi esta mesma força que me guiou e orientou na realização deste trabalho. Esta força Divina, a força do meu Pai, que me olhando das estrelas sussurrava ao ouvido “*filhota tu és capaz!*”, que me deram inspiração nesta etapa da minha vida. A ti pai, a ti Deus o meu coração eternamente vos agradece.

A realização desta dissertação, passa também por pessoas especiais que me acompanharam desde o início, a elas o meu sentimento de gratidão:

À minha mãe Ana, ao meu tio Rui Dantas e a toda a família que com todo o seu amor não me deixaram desistir, dando-me força, “colo” e incentivo nos dias difíceis;

Ao meu orientador e amigo Professor Doutor José Miguel Azevedo Pereira, que desde o início acreditou neste projeto, acreditando em mim, esteve sempre disponível para orientar, corrigir, melhorar todo este trabalho com toda a sua sabedoria e amizade;

Às minhas colegas e amigas Donata e Jaqueline, pela sua amizade, dedicação e compreensão. A todos os laços de amizade criados na ilha do Porto Santo, amigos que compreenderam muitas vezes as minhas ausências para dedicar-me a este projeto;

Às minhas queridas amigas Ludi e Águeda, pelo seu amor paciente, de ouvirem os meus medos e lembrarem-me de que eles eram apenas ilusões;

À “família yogi”, em especial ao Jinanátman, Atul, Maetreyii, Anandala, Anandii, Dharmapal, pelos maravilhosos momentos partilhados ao ritmo do tambor e ao eterno som de Baba Nam Kevalam;

À Dra. Paula Luísa Fernandes, que me acolheu na sua equipa de trabalho, podendo assim dar os primeiros passos em biologia molecular. Às minhas colegas de trabalho pela boa disposição sentida dia a dia, o que nos tronava um grupo de trabalho único;

À Dra. Graça Andrade, pela disponibilidade e acessibilidade na autorização e fornecimento da peça crucial que permitiu a realização deste projeto.

A Todos, Muito Grata!

## Resumo

A extensão mundial de doenças infecciosas que provocam morbidade e mortalidade entre a população, deve-se em boa parte aos vírus, inclusivamente ao vírus *Influenza A*. A sua capacidade de diversidade genética leva ao surgimento de epidemias (*drift* antigénico) e de pandemias (*shift* antigénico).

A história da humanidade vem sendo afetada com as principais pandemias provocadas pelo vírus *Influenza A*, nomeadamente: a “Gripe Espanhola” (H1N1) em 1918; a “Gripe Asiática” (H2N2) em 1957; “Gripe de Hong Kong” (H3N2) em 1968; a “Gripe Russa” (H1N1) em 1977; a “Gripe das Aves” (H5N1) em 1997 e por último a “Gripe Suína” (H1N1) em 2009.

Surgindo no México, o vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) resultou de um triplo *reassortment*, entre os segmentos de genes provenientes do vírus *Influenza A*: das aves Norte-americanas; dos humanos e dos suínos. A sua disseminação ocorreu em largo espetro, chegando a Portugal e consequentemente à Região Autónoma da Madeira.

A presente dissertação, descreve o que ocorreu na Arquipélago da Madeira no ano de 2009 com a disseminação do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) entre a população residente e visitante. Foram analisadas de abril a dezembro desse ano, 1687 amostras de indivíduos com suspeita de infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09, pela técnica de RT-qPCR. No total, o vírus provocou infeção a 691 (41,0%) indivíduos nativos e visitantes, levando à morte 10 (1,4%) residentes da região.

Palavras-Chaves: *Influenza A*, Pandemia, A(H1N1)pdm09, RT-qPCR.

## **Abstract**

The worldwide spread of infectious diseases that cause morbidity and mortality among the population is largely due to viruses, including Influenza A virus. Its genetic diversity capacity leads to epidemics (antigenic drift) and pandemics (antigenic shift).

The history of humanity has been affected by main pandemics caused by the virus Influenza A, namely: the “Spanish Flu” (H1N1) in 1918; the “Asian Flu” (H2N2) in 1957; “Hong Kong Flu” (H3N2) in 1968; the "Russian Flu" (H1N1) in 1977; the "Avian Flu" (H5N1) in 1997 and finally the "Swine Flu" (H1N1) in 2009.

Emerging in Mexico, the 2009 pandemic virus Influenza A (H1N1) resulted from a triple reassortment, between gene segments belonging to different strains of Influenza A virus: from North American birds, humans and pigs. It has spread worldwide, reaching Portugal and consequently the Autonomous Region of Madeira (ARM).

This dissertation describes what happened in ARM during 2009 with the spread of the 2009 influenza pandemic virus (H1N1) between the resident and visiting population. From April to December of that year, 1687 samples from individuals suspected of A(H1N1)pdm09 virus infection were analyzed by the RT-qPCR technique. In total, the virus caused infection to 691 (41.0%) native and visiting individuals, leading to ten deaths (1.4%) among ARM residents.

**Keywords:** *Influenza A*, Pandemic, A(H1N1)pdm09, RT-qPCR.

# Índice

<b>Resumo</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>10</b>
<b>Índice de Tabelas</b>	<b>15</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>17</b>
<b>Glossário</b>	<b>20</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>22</b>
1.1. O Vírus <i>Influenza</i>	22
<b>2. O Vírus <i>Influenza A</i></b>	<b>24</b>
2.1. Morfologia e genoma da partícula viral do vírus <i>Influenza A</i>	25
2.1.1. Hemaglutinina (HA)	26
2.1.2. Neuraminidase (NA)	27
2.1.3. Proteínas da matriz M1 e canal iónico M2	27
2.1.4. Nucleoproteínas (NP)	28
2.1.5. Proteínas não estruturais NS1 e NS2	28
2.1.6. Complexo das Polimerases viral (PB1, PB2 e PA)	29
2.1.7. Complexo Ribonucleoproteico viral (RNP)	29
2.2. Ciclo replicativo do vírus <i>Influenza A</i>	30
2.2.1. Etapas iniciais: ligação ao ácido siálico, entrada na célula hospedeira e descapsidação da partícula viral	30
2.2.2. Síntese de macromoléculas: transcrição, tradução e replicação	31
2.2.3. Etapas finais: morfogénese, libertação e maturação	33
<b>3. Das aves aquáticas aos seres humanos – Origem da diversidade do vírus <i>Influenza A</i></b>	<b>35</b>
<b>4. Epidemiologia do vírus <i>Influenza A</i> numa perspetiva histórica e contemporânea</b>	<b>38</b>
<b>5. O vírus pandémico 2009 <i>Influenza A</i> (H1N1)</b>	<b>44</b>
5.1. A primeira pandemia do século XXI – no Mundo, Europa e em Portugal	44
5.2. O triplo reassortment do vírus pandémico 2009 <i>Influenza A</i> (H1N1) na emergência da pandemia.	49
<b>6. Métodos de diagnóstico laboratorial do vírus <i>Influenza</i> no ser humano</b>	<b>52</b>
6.1. Isolamento do vírus	54

6.2.	Técnica de amplificação do ácido nucleico	55
6.3.	Métodos Serológicos	55
6.3.1.	Inibição da hemaglutinina (HI)	56
6.3.2.	Teste de neutralização do vírus (VN)	56
6.3.3.	Fixação do complemento (CF)	56
6.3.4.	Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)	57
6.4.	Imunofluorescência direta de anticorpos (DFA)	57
6.5.	Testes de diagnóstico rápido de Influenza (RIDTs)	58
6.6.	Diagnóstico laboratorial para a deteção do vírus pandémico 2009 <i>Influenza A</i> (H1N1)	58
<b>7.</b>	<b>Enquadramento do projeto e objetivos</b>	<b>61</b>
7.1.	Enquadramento do projeto	61
7.2.	Objetivos gerais	61
7.3.	Objetivos específicos	61
<b>8.</b>	<b>Metodologias Experimentais</b>	<b>63</b>
8.1.	Delineamento do estudo	63
8.2.	Local do estudo	63
8.3.	Amostras do Estudo	63
8.4.	Colheitas e processamento de amostras biológicas	64
8.4.1.	Colheita de amostras biológicas para o diagnóstico vírus pandémico 2009 <i>Influenza A</i> (H1N1)	64
8.4.2.	Preparação/ tratamento das amostras para a fase de extração do ácido nucleico	65
8.4.3.	Extração dos ácidos nucleicos	65
8.4.4.	Deteção dos ácidos nucleicos	68
8.5.	Análise estatística dos resultados	69
<b>9.</b>	<b>Resultados e interpretação</b>	<b>70</b>
9.1.	Estudo da prevalência das amostras analisadas	73
9.2.	Distribuição dos casos por infeção do vírus pandémico 2009 <i>Influenza A</i> (H1N1)	77
9.3.	Distribuição dos casos de mortalidade por infeção pelo vírus pandémico 2009 <i>Influenza A</i> (H1N1)	81
<b>10.</b>	<b>Discussão</b>	<b>83</b>
10.1.	Sintomatologia, Morbilidades e Internamentos	83
10.2.	Género	85

10.3.	Sexo Feminino e Gestação	86
10.4.	Faixas Etárias	87
10.5.	Distribuição Temporal e Distribuição Geográfica	89
10.6.	Mortalidade por infeção do vírus pandémico 2009 <i>Influenza A</i> (H1N1)	92
<b>11.</b>	<b>Conclusão</b>	<b>93</b>
<b>12.</b>	<b>Anexos</b>	<b>96</b>
12.1.	<i>Kit Transport Medium da Vircell</i>	96
12.2.	<i>Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit da QIAGEN®</i>	97
12.3.	<i>Kit EZ1 Vírus Mini Kit v2.0 da QIAGEN®</i>	98
12.4.	<i>Kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR da Applied Biosystems</i>	99
12.5.	Esquema de extração do RNA do vírus	100
12.6.	<i>Kit TaqMan™ Influenza A (H1N1) Assay Set</i>	101
12.7.	Preparação das MasterMix para protocolo de deteção dos ácidos nucleicos	102
12.8.	Esquema de pipetagem da microplaca de 96 poços utilizada em RT-qPCR	102
12.9.	Tabelas de frequências dos resultados estatísticos	103
12.9.1.	Tabela de frequência e de percentagem da morbilidade consoante o género	103
12.9.2.	Tabela de frequência da distribuição geográfica relativamente à distribuição temporal	104
12.9.3.	Tabela de frequência do diagnóstico do vírus A(H1N1)pdm09 de 2010 a 2012	104
12.10.	Formulários da Gripe OT-3	105
12.11.	Folha de trabalho do registo das amostras e resultado	106
<b>13.</b>	<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>107</b>

## Índice de Figuras

**Figura 1. Nomenclatura do vírus *Influenza A*.** *A*, tipo de vírus com base na nucleoproteína e proteína da matriz. *Fujian*, local onde o vírus foi isolado pela primeira vez. *411*, número da estirpe. *2002*, ano que o vírus foi isolado. (*H3N2*), subtipo do vírus com base na hemaglutinina (*H3*) e Neuraminidase (*N2*) («Influenza - Wikipedia»). .....24

**Figura 2. Composição da partícula viral do vírus *Influenza A*.** Três proteínas transmembranares: Hemaglutinina (HA), composta pelas duas subunidades HA1 e HA2; Neuraminidase (NA); canais iónicos (M2). Internamente a proteína da matriz M1 e o genoma de RNA (oito segmentos de cadeia simples de polaridade negativa) que comporta as proteínas da nucleocápside, designadas por nucleoproteínas (NP) e as polimerases virais (PA, PB1 e PB2) (Karlsson Hedestam et al., 2008). .....26

**Figura 3. Estrutura da Hemaglutinina.** Os monómeros encontram-se representados pela cor cinza, roxo e laranja. O círculo vermelho indica o local de ligação ao ácido siálico. HA1 subunidade de ligação ao ácido siálico. HA2 subunidade de fusão (Stencel-Baerenwald, Reiss, Reiter, Stehle, & Dermody, 2014) .....27


**Figura 4. Estrutura do Complexo Ribonucleoproteico do vírus *Influenza A*.** O complexo das polimerases (PB1 a roxo, PB2 a verde e a azul a PA) num das extremidades ligado ao RNA do vírus. Os círculos a verde representam os monómeros de NP. A linha azul, o genoma de RNA do vírus (Shi, Wu, Zhang, Qi, & Gao, 2014). .....30


**Figura 5. Ciclo replicativo do vírus *Influenza A*.** Encontram-se representadas as etapas precoces: ligação, entrada e descapsidação (1). (2) A importação nuclear do complexo RNP. (3) Transcrição primária do RNA<sub>v</sub> em mRNA<sub>v</sub>. Subsequentemente ocorre a exportação deste mRNA<sub>v</sub> para o citoplasma onde será traduzido em proteínas virais, que posteriormente voltam a entrar no núcleo da célula hospedeira para integrarem na (4) replicação do genoma viral. (5) Exportação nuclear dos complexos RNPs recém-sintetizados. (6) Transporte dos complexos RNPs para a morfogénese (7) e libertação (não ilustrado) (Eisfeld et al., 2014). .....31

**Figura 6. Mecanismo de *shift* antigénico.** O *reassortment* genético, que ocorre no suíno quando este é infetado por duas variantes. H1N1 e H3N2. Após o *reassortment* forma-se o novo subtipo H1N1 (Sandbulte et al., 2015). .....36


**Figura 7. Mecanismo de *drift* antigénico.** Ao longo do tempo mutações aleatórias nos genes HA e NA do vírus *Influenza A* nos suínos podem causar alterações significativas nas suas propriedades antigénicas. Em **A**, os suínos possuem anticorpos neutralizantes para a estirpe H3N2. Em **B**, através do mecanismo de *drift* antigénico é produzido uma nova variante. Em **C**, os suínos infetados com a nova variante do vírus, sendo os seus anticorpos pré-existentz incapazes de neutralizar esta nova variante, tornando-os suscetíveis a uma reinfeção (Sandbulte et al., 2015).....37

**Figura 8. Reassortment das principais pandemias do vírus *Influenza A* do século XX.** Em 1918 a “Gripe Espanhola”, subtipo H1N1, resulta de um *reassortment* entre o vírus das aves e dos mamíferos. Após 1918, o subtipo H1N1 causou epidemias sazonais até 1957, quando o subtipo H2N2 emerge como “Gripe Asiática”, após um *reassortment* entre o H1N1 e o H2N2 das aves, introduzindo os genes PB1, NA e HA presente nas aves. Este vírus circulou nos humanos até ao surgimento de uma nova pandemia em 1968 a “Gripe de Hong Kong”, causada pelo *reassortment* do H2N2 com um vírus H3 das aves, resultando na troca dos segmentos genómicos HA e PB1 formando o subtipo H3N2. Adaptação de Sorrell et al., 2011. ....43

**Figura 9. Mapa do mundo referente ao número de morte confirmadas pelo vírus A(H1N1)pdm09.** A 21 de dezembro de 2009, a maioria dos países no mundo relatavam mortes confirmadas pelo vírus da gripe, à exceção dos países que se encontram a verdes no mapa. A escala de cor  refere-se ao número de mortes confirmadas nos diferentes países do mundo, respetivamente (do tom mais escuro ao mais claro): mais de 5000 mortes; mais de 1000 mortes; mais de 500 mortes; mais de 100 mortes; mais de 50 mortes; mais de 10 mortes; mais de 5 mortes e mais de 1 morte («File:H1N1 map by confirmed deaths.svg»). .....47

**Figura 10. Mapa do mundo de casos confirmados pelo vírus A(H1N1)pdm09.** A 21 de dezembro de 2009, a maioria dos países no mundo apresentavam casos confirmados para o vírus da gripe, à exceção dos países que se encontram de cor cinza. A escala de cor  refere-se ao número de casos confirmados pelos diferentes país do mundo com: mais de 50 000 casos; mais de 5 000 casos; mais de 500 casos; mais de 50 casos; mais de 5 casos e mais de 1 caso, respetivamente (do tom mais escuro para o tom mais claro) («File:H1N1 map by confirmed cases.svg»). .....47

**Figura 11. Disseminação do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) A. Mapa da Europa de casos confirmados pelo vírus A(H1N1)pdm09.** A 27 de maio de 2009, todos

os países da Europa apresentavam casos confirmados para o vírus da gripe, à exceção da Cidade do Vaticano sem nenhum caso confirmado (ponto cinza no mapa). A escala de cor  refere-se ao número de casos confirmados na Europa por país com: mais de 50 000 casos; mais de 5 000 casos; mais de 500 casos; mais de 50 casos; mais de 5 casos e mais de 1 caso, respetivamente (do tom mais escuro para o tom mais claro) («Pandemia de gripe A de 2009 na Europa», 2016).....48

**Figura 12. Distribuição em Portugal dos casos do vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)*.** O gráfico representa a distribuição percentual dos casos de A(H1N1)pdm09 em Portugal no período de 24 abril e 21 de agosto de 2009 (George et al., 2010). .....49

**Figura 13. Origem do vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)*.** *Reassortment* na origem do vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)*, emergência do subtipo H3N2 e H1N2 nos suínos como consequência do *reassortment* genómico, entre os subtipos H1N1 suíno; subtipo desconhecido (H?N?) das aves Norte-Americanas e o subtipo H3N2 humano. Em 2009 um novo *reassortment* entre o subtipo H1N2 dos suínos e o subtipo H1N1 dos suínos Euroasiáticos faz emergir o vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)*. Adaptação de. Obuchi et al., 2013.....51

**Figura 14. Métodos de diagnóstico disponíveis nos diferentes ambientes laboratoriais.** As setas a verde, referem-se os métodos disponíveis no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça. Adaptado de World Health Organization, 2010. ....54

**Figura 15. Reação em cadeia da polimerase antecedida pela transcrição reversa em tempo real.** Esquema RT-qPCR com a utilização de sondas TaqMan. Síntese do cDNA a partir do *template* RNA – transcrição reversa. Após a desnaturação (não ilustrado), os *primers* e a sonda TaqMan hibridam nos seus alvos. A sonda contém um fluorocromo *reporter* na extremidade 5', e na extremidade 3' o *quencher*. Durante a elongação, a atividade nucleasa 5' da Taq polimerase desloca-se e cliva a sonda. Separação física do *reporter-quencher*. Emissão de fluorescência do *reporter*. O aumento do sinal de fluorescência é diretamente proporcional ao número de moléculas *reporter* libertadas durante esse ciclo de PCR. Adaptado de Bustin & Mueller, 2005.....60

**Figura 16. Suporte de trabalho do *EZI Advanced*.** 1. Tubos de Eluado (1,5 ml); 2. Suportes e pontas com filtro descartáveis; 3. Tubo de 1,5 ml com RNA *carrier* – Tampão

AVE; 4. Tubos de 2 ml com amostra; 5. Cartucho de reagente; 6. Tubos de 1,5 ml no bloco de aquecimento (QIAGEN, 2010).....68

**Figura 17. Resultados obtidos na detecção do vírus pandêmico 2009 *Influenza A (H1N1)*.** Gráfico superior – resultado negativo para o vírus A(H1N1)pdm09. Gráfico inferior – resultado positivo para o vírus A(H1N1)pdm09. Os gráficos mostram: no eixo do y o  $\Delta Rn$  e no eixo do x o número de ciclos da reação de PCR. O gráfico de cima representa um resultado negativo para o vírus pandêmico, apenas existe emissão de fluorescência na sonda RNaseP. O gráfico de baixo representa um resultado positivo para o vírus pandêmico, detetou-se emissão de fluorescência para as 4 sondas (swInfA, InfA, swH1 e RNaseP). A azul, swInfA – sonda do vírus *Influenza A* suíno. A amarelo, InfA – sonda do vírus *Influenza A*. A vermelho, swH1 – sonda do vírus *Influenza H1* suíno. A verde, RNaseP – sonda do gene RNase P humano. ....72

**Figura 18.** Gráfico da distribuição, em frequência, do número total de casos estudado em 2009 por mês. ....74

**Figura 19.** Gráfico da distribuição, em frequência, do número total de casos estudado em 2009 por faixa etária. ....75

**Figura 20.** Gráfico da distribuição, em frequência, do número de casos de infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoantes os meses do estudo. ....78

**Figura 21.** Gráfico representativo da distribuição, em frequência, do número de casos de infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoantes as faixas etárias. ....79

**Figura 22.** Gráfico representativo da distribuição, em frequência, da mortalidade provocada pela infecção do vírus A(H1N1)pdm09 consoante as faixas etárias. ....82

**Figura 23** Gráfico representativo da distribuição do número de casos estudados (linha azul) e dos casos confirmados como positivos para o vírus A(H1N1)pdm09 (linha laranja) consoante as faixas etárias, no ano de 2009. ....88

**Figura 24.** Gráfico representativo da distribuição, em frequência, dos casos estudados aos longo dos meses, consoante a distribuição geográfica.....91

**Figura 25.** Gráfico representativo da distribuição do turismo, tendo em conta o número de dormidas segundo os meses do ano. Fonte: (Direcção Regional do Turismo, 2010).....91

**Figura 26. Esquema de extração de ácidos nucleicos.** À esquerda, extração do RNA viral pelo método manual pelo *kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* da QIAGEN® (QIAGEN, 2014). À direita, extração do RNA viral pelo método automático com o *kit EZ1 Virus Mini Kit v2.0* da QIAGEN® (QIAGEN, 2010). .....100

## Índice de Tabelas

**Tabela 1.** Comparação dos métodos de diagnóstico do vírus *Influenza* no ser humano, segundo a escala: -2 muito desfavorável; -1 desfavorável; 0 característica média; +1 favorável e +2 muito favorável (Kamps et al., 2006).....53

**Tabela 2.** Distribuição, em frequência e percentagem, dos casos estudados consoante: Sintomatologia; Internamento; Distribuição Geográfica; Resultado do diagnóstico de A(H1N1)pdm09; Género; Gravidez; Morbilidade; Internamento com Morbilidades e Mortalidade. ....76

**Tabela 3.** Distribuição, em frequência e percentagem, dos casos positivos para a infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoante: Sintomatologia; Internamento; Distribuição geográfica; Género; Gravidez; Morbilidade; Internamento com Morbilidade e Mortalidade.....80

**Tabela 4.** Distribuição, em frequência e percentagem, da mortalidade resultado da infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoante: Género, Gravidez; Mês e Morbilidade. .82

**Tabela 5.** Conteúdo e composição do kit *transport Medium* da *Vircell* (Vircell, 2012). .....96

**Tabela 6.** Componentes; Unidades/ Volumes e Preparação dos reagentes / Observações, dos constituintes do Kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* da *QIAGEN*®, utilizados na extração manual do RNA viral do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) para 50 reações (QIAGEN, 2014). .....97

**Tabela 7.** Componentes; Unidades/ Volumes e Preparação dos reagentes / Observações, dos constituintes do Kit *EZI Virus Mini Kit v2.0* da *QIAGEN*®, utilizados na extração automática através do equipamento *EZI Advanced* do RNA viral do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) para 48 preparações (QIAGEN, 2010).....98

**Tabela 8.** Componentes, volumes e composição dos reagentes presentes no kit *AgPath-ID™ One-Step RT-PCR* da Applied Biosystems, utilizado na deteção do RNA do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) (Applied Biosystems®, 2009).....99

**Tabela 9.** Componentes, sondas, *primers*, volumes, concentrações e sequencia nucleotidica de 5' > 3', presentes no *Kit TaqMan™ Influenza A (H1N1) Assay Set* da *Applied Biosystems*, utilizado na detecção do RNA do vírus pandémico *Influenza A (H1N1) 2009*. “T” significa que as sondas, são marcadas na extremidade 5' com a molécula *reporter* 6-carboxifluoresceína (FAM) e na base “T” modificado com o *quencher* BHQ1 estando a extremidade 3' assim alterada evitando a extensão da sonda pela Taq polimerase (World Health Organization, 2009a)..... 101

**Tabela 10.** Tabela de preparação das *MasterMix*. Soluções utilizadas e respetivos volumes na preparação de cada *MasterMix* (1, 2, 3 e 4) segundo o número de rações a processar. O número de reações foi determinado pela soma de: número total de amostras, o controlo negativo (NTC), o controlo positivo (PC) e mais uma reação (erros de pipetam). ..... 102

**Tabela 11.** Esquematização do modo de pipetar a microplaca com 96 poços para a detecção do vírus pandémico *Influenza A (H1N1) 2009*. Por coluna foram pipetadas 20 µL de cada *MasterMix* e por linhas 5 µL do CP, NTC e amostras. .... 102

**Tabela 12.** Tabela de frequências e de percentagem, da morbilidade e morbilidade em caso de infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoante género. .... 103

**Tabela 13.** Tabela de frequências, dos casos estudados e infetados tendo em conta a distribuição geográfica consoante a distribuição temporal. .... 104

**Tabela 14.** Tabela de frequências e percentagem, do resultado do diagnóstico do vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)* no período de 2010 a 2012, na RAM. .... 104

## Lista de Abreviaturas

A – Adenina

Ac – Anticorpo

Ag – Antígeno

A(H1N1)pdm09 – Vírus pandêmico 2009 *Influenza A* (H1N1)

BHQ1- *Black Hole quencher 1*

BM – Biologia Molecular

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

BSS – Solução salina tamponada (do inglês *Buffered Salt Solution*)

C – Citosina

CF – Fixação do Complemento

CDC – Centro de Controlo e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

CRM1 – Proteína de exportação nuclear

cRNA - Ácido ribonucleico complementar

DFA – Imunofluorescência Direta de Anticorpos (do inglês *direct fluorescent antibody*)

DGS – Direção-Geral de Saúde

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *Deoxyribonucleic Acid*)

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (do inglês *Enzyme-linked Immunosorbent Assays*)

EUA – Estados Unidos da América

FAM – Corante fluorescente de amidite de fluoresceína

G – Guanina

HA ou H – Hemaglutinina

HEPES – Solução tampão (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinoetanosulfônico)

HI – Inibição da Hemaglutinina (do inglês *Hemagglutinin Inhibition*)

HNM – Hospital Dr. Nélio Mendonça

IMP $\alpha$  – Importina alfa (subunidade de proteínas de transporte)

IMP $\beta$  – Importina beta (subunidade de proteínas de transporte)

*Inf* – Influenza  
INSA – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
kpb – Mil pares de base  
LPC – Laboratório de Patologia Clínica  
M1 – Proteínas da matriz  
M2 – Proteína transmembranares com função de canal iónico  
mL – mililitro  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro  
mRNA<sub>v</sub> – Ácido ribonucleico mensageiro do vírus  
NA ou N – Neuraminidase  
NLSs – Sinais de localização nuclear (do inglês *Nuclear Localization Signal*)  
nm – Nanómetros  
NP; NPs – Nucleoproteína; Nucleoproteínas  
NPC – Complexos de poros nucleares (do inglês *Nuclear Pore Complex*)  
NS1 – Proteína não estrutural  
NS2 ou NEP – Proteína não estrutural de exportação nuclear (do inglês *Nuclear Export Protein*)  
NTC – Controlo Negativo  
NTP; NTPs – Nucleótido; Nucleótidos  
Nº - Número  
OMS – Organização Mundial de Saúde (do inglês *World Health Organization*)  
PA – Proteína alcalina do complexo da polimerase  
pb – Par de bases  
PB1 – Proteína básica 1 do complexo da polimerase  
PB2 – Proteína básica 2 do complexo da polimerase  
PC – Controlo Positivo  
qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo-Real (do inglês *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)  
RAM – Região Autónoma da Madeira  
RIDTs – Testes de Diagnóstico Rápido de *Influenza* (do inglês *Rapid Influenza Diagnostic Test*)  
RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *Ribonucleic Acid*)  
RNA<sub>v</sub> – Ácido ribonucleico do vírus  
RNP; RNPs – Complexo Ribonucleoproteico; Complexos Ribonucleoproteico

cRNP – Complexo Ribonucleoproteico Complementar  
rpm – rotação por minuto  
RT-qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real antecedida pela Transcrição Reversa (do inglês *Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*)  
SDS - dodecil-sulfato de sódio (do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate*)  
Seg. – Segundos  
SPSS – programa estatístico para as ciências sociais (do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*)  
SW – suíno (do inglês *swine*)  
T - Tiamina  
TACSP – Técnicos de Análises Clínicas e Saúde Pública  
U – Uracilo  
UE – União Europeia  
Uni. – Unidade  
VN - Teste de Neutralização do vírus (do inglês *Viral Neutralization Assay*)  
µG - Micrograma  
µL – Microlitro  
-ssRNA – Ácido ribonucleico de cadeia simples de polaridade negativa  
°C – Graus Celsius  
v/v – volume / volume  
ΔRn – Quantidade de fluorescência emitida  
% - Percentagem

## Glossário

*Cap-snatching* – mecanismo pelo qual a extremidade cap do RNA da célula é clivada em alguns nucleótidos a jusante da extremidade 5' -*cap* pela atividade de uma endonuclease.

Cápside – cápsula de natureza proteica que cerca e protege o genoma do vírus, constituída por múltiplas subunidades de proteínas designando-se de capsómeros, tomando a forma icosaédrica ou tubular.

Cauda poli(A) – sequência repetitiva de adeninas localizadas na extremidade 3' do mRNA.

Enzoótico - Endémico em animais. Uma doença enzoótica está constantemente presente numa população animal, mas geralmente só afeta um pequeno número de animais, em qualquer momento.

Invólucro - membrana lipoprotéica que se forma a partir da membrana plasmática ou de outras membranas, das células hospedeiras que envolve alguns vírus.

Pleomórficos – capacidade de o vírus de apresentar diferentes formas. Por exemplo: forma esférica ou filamentosa.

Poliadenilação – termo que designa a formação de cauda poli(A) na extremidade 3' de um ácido nucléico.

*Primer* – pequeno fragmento de cadeia simples de ácido nucleico, normalmente com 17 nucleotídeos, complementares a uma sequência de DNA ou RNA.

*Proofreading* – designação para o mecanismo de correção de erros processados na síntese de ácidos nucleicos (ou proteínas) e que envolve a inspeção de todas as

unidades individuais após as suas incorporações na cadeia nascente (sinónimo de correção de erros).

*Rafts* lipídicos - estruturas lipídicas não iónicas, ricas em esfingolípidos, que se encontram dentro da membrana plasmática.

RNase P – ribonuclease nuclear P é uma endonuclease essencial, conservada ao longo da evolução.

*Reassortment* – mistura de material genético de uma espécie com novas combinações de indivíduos diferentes.

*Splicing* – mecanismo pelo qual o percurso do RNA mensageiro (pré-mRNA) é transcrito num RNA mensageiro dito “maduro” (mRNA). Através da remoção dos intrões (parte do gene não codificante) e ligação dos exões (parte codificante do gene).

*Splicing* alternativo – mecanismo pelo qual os intrões são removidos em locais diferentes no pré-mRNA, resultando em produtos funcionais distintos.

*Template* – cadeia de ácido nucleico que serve como modelo, durante a replicação ou transcrição, utilizada na síntese da cadeia complementar de DNA ou RNA (respetivamente).

Virião – uma única partícula viral. Partícula viral infecciosa.

## 1. Introdução

As doenças infecciosas continuam a ser a principal causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, causadas por agentes infecciosos. Estes agentes podem replicar-se, tanto no ambiente como em associação com um hospedeiro; podem provocar algum tipo de resposta, imunológica, inflamatória ou degenerativa, no hospedeiro (Paul D. Hoepfich, M. Colin Jordan, & Allan R. Ronald, 1994), sendo que as infecções virais contribuem significativamente para o volume global das doenças infecciosas. A maioria destas infecções têm expressão clínica ligeira a moderada, podendo causar complicações graves em indivíduos suscetíveis, como no caso dos indivíduos subnutridos, imuno-comprometidos, os mais novos e os mais velhos (Aldigs, 2014).

Os vírus que infetam o Homem, são descritos como uma pequena partícula, cujo tamanho pode variar entre os 20-200 nm, constituída por um genoma de ácido nucleico, ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA), protegido por uma cápside. Pode ou não ter um invólucro. Só são capazes de se replicar dentro da célula hospedeira. O genoma viral codifica apenas as proteínas necessárias à sua replicação, podendo ser proteínas estruturais que fazem parte da estrutura do virião, por exemplo proteína da matriz M1, ou não estruturais, como por exemplo as polimerases (Aldigs, 2014).

### 1.1. O Vírus *Influenza*

O vírus *Influenza* ou o vírus da gripe, assim designado habitualmente, não passa de uma contrariedade para a maioria da população. Trata-se de uma doença infecciosa aguda que acomete o trato respiratório, com início súbito de febre, mal-estar, dores de cabeça e mialgias, tendo um período de recuperação em seres humanos saudáveis, normalmente de uma semana. No entanto, em situações particulares pode assumir graus de elevada morbidade e mortalidade (Humphries, 2005; Liu, 1994). A gripe é historicamente uma doença que causa epidemias anuais e num intervalo de

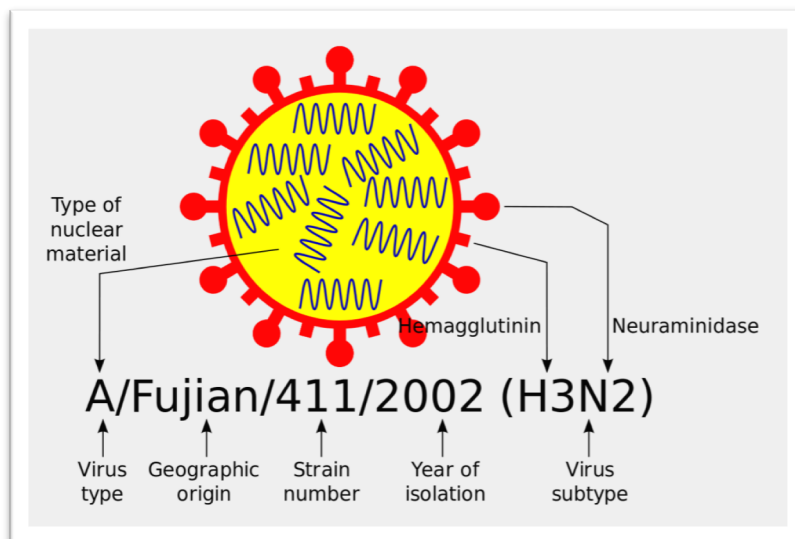
tempo irregular, as pandemias (Salomon & Webster, 2009). Anualmente estima-se que o vírus *Influenza* cause entre 3 - 5 milhões de infecções clínicas severas e 250 – 500 mil casos fatais no mundo (Sandt, Kreijtz, & Rimmelzwaan, 2012). Estes números são alcançados pelo fato de ser um vírus facilmente transmissível, através de gotículas de aerossóis que ao inaladas infetam as células epiteliais do trato respiratório do hospedeiro (Hilleman, 2002).

Os vírus *Influenza* são classificados como membro de uma família denominada *Orthomyxoviridae*. Atualmente esta família é composta por sete gêneros: *Influenzavirus A*; *Influenzavirus B*; *Influenzavirus C*; *Influenzavirus D*; *Thogovirus*; *Isavirus* e o *Quarantavirus* (Presti et al., 2009; Szewczyk, Bienkowska-Szewczyk, & Król, 2014). A espécie *Quarantifil* do gênero *Quarantavirus*, foi isolado em 1953 perto do Cairo, Egito, através de cultura de vírus a partir de amostras de sangue de duas crianças doentes com febres moderadas (Presti et al., 2009). O gênero *Isavirus* contém um vírus altamente virulento, capaz de causar anemia infecciosa no salmão em aquaculturas em todo o mundo (Szewczyk et al., 2014). Os vírus pertencentes ao gênero *Thogovirus* encontram-se associados aos carrapatos, existindo dois vírus deste gênero, o *Thogoto* e o *Dhori*, que atualmente são conhecidos por causar doenças infecciosas nos humanos (Olga I. Kosoy et al., 2015). O vírus *Influenza D* é o mais recente membro desta família, identificado pela primeira vez em 2011, presente nos suínos com doença respiratória. Posteriormente foi isolado em gado nos Estados Unidos e França (Ducatez, Pelletier, & Meyer, 2015). O vírus *Influenza C*, foi isolado em 1947 e desde então encontra-se distribuído amplamente por todo o mundo. Estão associados a uma simples constipação principalmente nas crianças (Matsuzaki et al., 2006). O vírus *Influenza B* são capazes de infetar humanos, causando epidemias sazonais, durante o inverno. Atualmente existem duas estirpes do vírus *Influenza B* que se encontra em circulação nomeadamente, a B /Yamagata e a B /Victoria. O vírus *Influenza A* infeta humanos e outros animais, causando não só epidemias sazonais como pandemias nos seres humanos («Types of Influenza Viruses | Seasonal Influenza (Flu) | CDC», 2017).

Os três gêneros, *Influenza A*, *B* e *C* são identificados por diferenças antigénicas entre as suas nucleoproteínas (NPs) e as proteínas da matriz (M1) (Hause et al., 2014), enquanto que os principais determinantes antigénicos dos vírus *Influenza A* e *B* são as

suas glicoproteínas transmembranares do invólucro viral, a hemaglutinina (HA ou H) e a neuraminidase (NA ou N). Com base nessas características antigénicas foram identificados no vírus *Influenza A*, 17 subtipos de HA denominados H1, H2, H3 e assim sucessivamente até ao H17 e 10 subtipos de NA, designados por N1, N2, N3 até ao N10 (Gurtler, 2006; Martín-Benito & Ortín, 2013).

A nomenclatura completa dos isolados do vírus *Influenza*, como os exemplos; A/Sydney/5/97(H3N2), A/Ganso/Guangdong/1/96(H5N1) e A/Fujian/411/2002(H3N2) tem em conta as seguintes características: o tipo do vírus; a espécie hospedeira (esta é omitida se for de origem humana); o local geográfico do primeiro isolado; número de série (o número laboratorial da estirpe, atribuído de acordo com a ordem cronológica de isolamento, em determinada localidade); ano de isolamento; as variantes H e N colocadas entre parêntesis (Figura 1) (Gurtler, 2006; Mackenzie, Kelso, & Hampson, 2014).



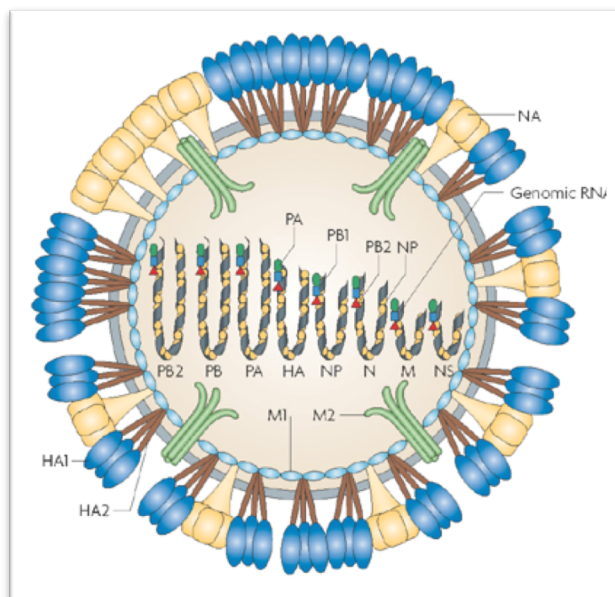
**Figura 1. Nomenclatura do vírus *Influenza A*.** *A*, tipo de vírus com base na nucleoproteína e proteína da matriz. *Fujian*, local onde o vírus foi isolado pela primeira vez. *411*, número da estirpe. *2002*, ano que o vírus foi isolado. (*H3N2*), subtipo do vírus com base na hemaglutinina (*H3*) e Neuraminidase (*N2*) («Influenza - Wikipedia»).

## 2. O Vírus *Influenza A*

## 2.1. Morfologia e genoma da partícula viral do vírus *Influenza A*

Morfologicamente os vírus *Influenza A* são pleomórficos, embora geralmente se apresentam sob uma forma esférica com um diâmetro entre os 100 a 200 nm (Szewczyk et al., 2014). O invólucro do vírus é composto por uma bicamada lipídica contendo três proteínas transmembranares, a HA, a NA e a M2 (canal iônico), e localizada na face interior do invólucro, a M1 (Nayak, Balogun, Yamada, Zhou, & Barman, 2009).

O genoma do vírus *Influenza A*, apresenta um tamanho de 13,5 kpb e é constituído por 8 segmentos de RNA de cadeia simples de polaridade negativa (-ssRNA), cujo tamanho varia entre 890 a 2341 pb (pares de bases) (Krejčova, Michalek, Hynek, Adam, & Kizek, 2015). Este RNA juntamente com a NP e o complexo de polimerases (PA, PB1 e PB2) formam um complexo designado por complexo ribonucleoproteico (RNP) e é sob esta forma que se encontram na cápside do vírus (Figura 2) (Gurtler, 2006; Martín-Benito & Ortín, 2013). Durante a transcrição e replicação cada segmento de RNA atua como uma unidade funcional independente, codificando proteínas que desempenham funções importantes nestes processos e para a consequente viabilidade do virião O 1º, 2º e 3º segmento de RNA transcrevem respetivamente as seguintes proteínas PA, PB1 e PB2. O 4º segmento codifica a HA, o 5º transcreve a NP, o 6º é responsável pela codificação da NA. A proteína M1 é transcrita pelo 7º segmento, assim como a M2, embora esta última sofra *splicing* a partir da transcrição de M1. O último segmento, 8, codifica uma proteína não estrutural (NS1), que ao sofrer *splicing* origina a proteína NS2 (Krejčova et al., 2015).



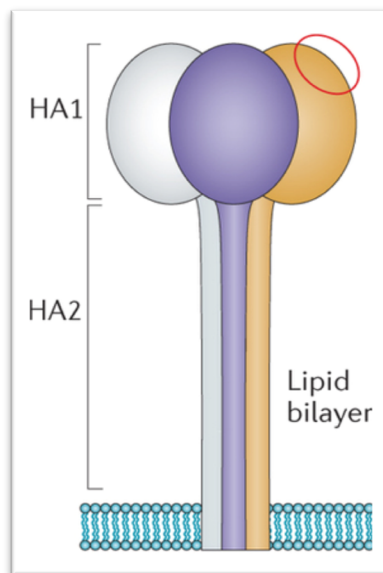
**Figura 2. Composição da partícula viral do vírus *Influenza A*.** Três proteínas transmembranares: Hemaglutinina (HA), composta pelas duas subunidades HA1 e HA2; Neuraminidase (NA); canais iônicos (M2). Internamente a proteína da matriz M1 e o genoma de RNA (oito segmentos de cadeia simples de polaridade negativa) que comporta as proteínas da nucleocápside, designadas por nucleoproteínas (NP) e as polimerases virais (PA, PB1 e PB2) (Karlsson Hedestam et al., 2008).

### 2.1.1. Hemaglutinina (HA)

A HA é uma glicoproteína transmembranar, como já foi referido anteriormente, mais abundante no invólucro viral (~80%). Apresenta um tamanho de 13,5 nm (Krejčova et al., 2015). A sua forma de espícula trimérica que se assemelha a um cogumelo, divide-se em duas subunidades: a HA1 e a HA2. A subunidade HA1 suporta os domínios de ligação aos recetores celulares do ácido siálico, enquanto que a subunidade HA2 é responsável pela fusão com a membrana endossomal (formada durante a entrada do vírus na célula hospedeira) e o invólucro viral (Figura 3) (Hilleman, 2002; Samji, 2009).

A ligação da HA às células epiteliais dos hospedeiros é concretizada através de recetores que se localizam nas células epiteliais do trato respiratório superior e inferior. A membrana citoplasmática destas células é composta por moléculas de ácido siálico. Estas moléculas podem apresentar um ou dois tipos de ligação,  $\alpha$  (2,3) e  $\alpha$  (2,6), consoante a espécie animal (Salomon & Webster, 2009). Assim por exemplo, as

células epiteliais do trato respiratório dos suínos, apresentam resíduos de ácido siálico com os dois tipos de ligações, por outro lado no trato respiratório dos humanos e das aves, apresentam respectivamente a ligação  $\alpha$  (2,6) e  $\alpha$  (2,3) (Samji, 2009).



**Figura 3. Estrutura da Hemaglutinina.** Os monómeros encontram-se representados pela cor cinza, roxo e laranja. O círculo vermelho indica o local de ligação ao ácido siálico. HA1 subunidade de ligação ao ácido siálico. HA2 subunidade de fusão (Stencel-Baerenwald, Reiss, Reiter, Stehle, & Dermody, 2014)

### 2.1.2. Neuraminidase (NA)

A NA é a segunda proteína mais abundante no invólucro do vírus (~17%) e apresenta-se sob a forma de espículas tetraméricas. Exerce uma função enzimática, clivando a ligação glicosídica entre HA e o ácido siálico, auxiliando a entrada do vírus na célula hospedeira (Gurtler, 2006). Outros papéis que desempenha remetem-se à libertação de novas partículas virais a partir da membrana celular, bem como a propagação e transmissão do vírus de hospedeiro para hospedeiro (Nayak et al., 2009).

### 2.1.3. Proteínas da matriz M1 e canal iônico M2

A proteína da matriz M1 forma uma camada estruturada sob o invólucro viral formando uma ponte entre este e a cápside, interagindo com o complexo RNP. Atua como fator de exportação nuclear e auxilia na morfogénese do vírus (Hilleman, 2002).

As proteínas M2 funcionam como canais iónicos das partículas virais, são os terceiros componentes mais abundantes no invólucro (~16-20 moléculas/virião), controlam o pH no complexo de Golgi durante a síntese de HA e na morfogénese de viriões. Desempenham ainda uma função crucial numa fase precoce da infeção, auxiliando na desagregação e libertação dos complexos de RNPs da matriz M1 (Nayak et al., 2009).

#### 2.1.4. Nucleoproteínas (NP)

As NP estão ligadas ao invólucro viral pela proteína M1, são proteínas essenciais na transcrição e replicação do vírus e estão ligados ao RNA genómico com alta afinidade mas sem especificidade (Martín-Benito & Ortín, 2013), formando o complexo NP-RNA. Interagem também com as subunidades PB1 e PB2 da polimerase viral (Krejčova et al., 2015). As NP desempenham um papel estrutural mantendo a configuração geral do complexo RNP (Martín-Benito & Ortín, 2013).

#### 2.1.5. Proteínas não estruturais NS1 e NS2

As proteínas não estruturais, NS1 e NS2, são formadas a partir do *splicing* alternativo do RNA mensageiro (mRNA) e possuem um papel fundamental na replicação. A NS1 é uma proteína de ligação ao RNA e está envolvida na regulação de muitos processos celulares, tais como: inibição da poliadenilação do mRNA do hospedeiro; inibição da exportação do mRNA poliadenilado do hospedeiro; inibição do *splicing* do mRNA e inibição da resposta antiviral mediada pelo interferão. Em suma a NS1 é uma proteína multifuncional e é importante na fuga ao sistema imunológico do hospedeiro (Krejčova et al., 2015).

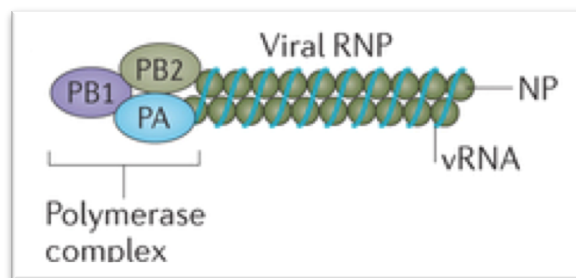
A NS2 também conhecida por NEP (proteína de exportação nuclear) (Martín-Benito & Ortín, 2013) é uma pequena molécula que está ligada à proteína M1 e tem como função facilitar o transporte dos complexos de RNPs recém-sintetizados do núcleo para o citoplasma (Gurtler, 2006).

#### 2.1.6. Complexo das Polimerases viral (PB1, PB2 e PA)

As polimerases do vírus *Influenza A* formam um complexo heterotrimérico composto por três subunidades proteicas: PB1, PB2 e a PA, com função enzimática na transcrição e replicação viral. A PB1 é identificada como a responsável pela polimerização do RNA. A PB2 mostrou-se ser necessária para o início da transcrição e está envolvida na replicação do RNA. Por último a PA está envolvida na proteólise induzida pelo vírus (Figura 4) (Martín-Benito & Ortín, 2013).

#### 2.1.7. Complexo Ribonucleoproteico viral (RNP)

Cada complexo de RNPs do vírus *Influenza* é composto por um -ssRNA associado a múltiplos monómeros de NP e a um complexo trimérico de polimerases (PB1, PB2 e PA). Os monómeros de NP ligam-se estequiometricamente (aproximadamente uma molécula de NP por 24 nucleótidos) ao RNA do vírus (RNA<sub>v</sub>), através dos polímeros de fosfatos do RNA, deixando as bases de RNA acessíveis para a duplicação ou emparelhamento do genoma. Uma das extremidades genômicas do RNA viral, não se encontra associada ao NP, mas sim ao complexo das polimerases viral. Na outra extremidade o RNA<sub>v</sub> permanece ligado ao NP (Figura 4) (Eisfeld, Neumann, & Kawaoka, 2014).



**Figura 4. Estrutura do Complexo Ribonucleoproteico do vírus *Influenza A*.** O complexo das polimerases (PB1 a roxo, PB2 a verde e a azul a PA) num das extremidades ligado ao RNA do vírus. Os círculos a verde representam os monómeros de NP. A linha azul, o genoma de RNA do vírus (Shi, Wu, Zhang, Qi, & Gao, 2014).

## 2.2. Ciclo replicativo do vírus *Influenza A*

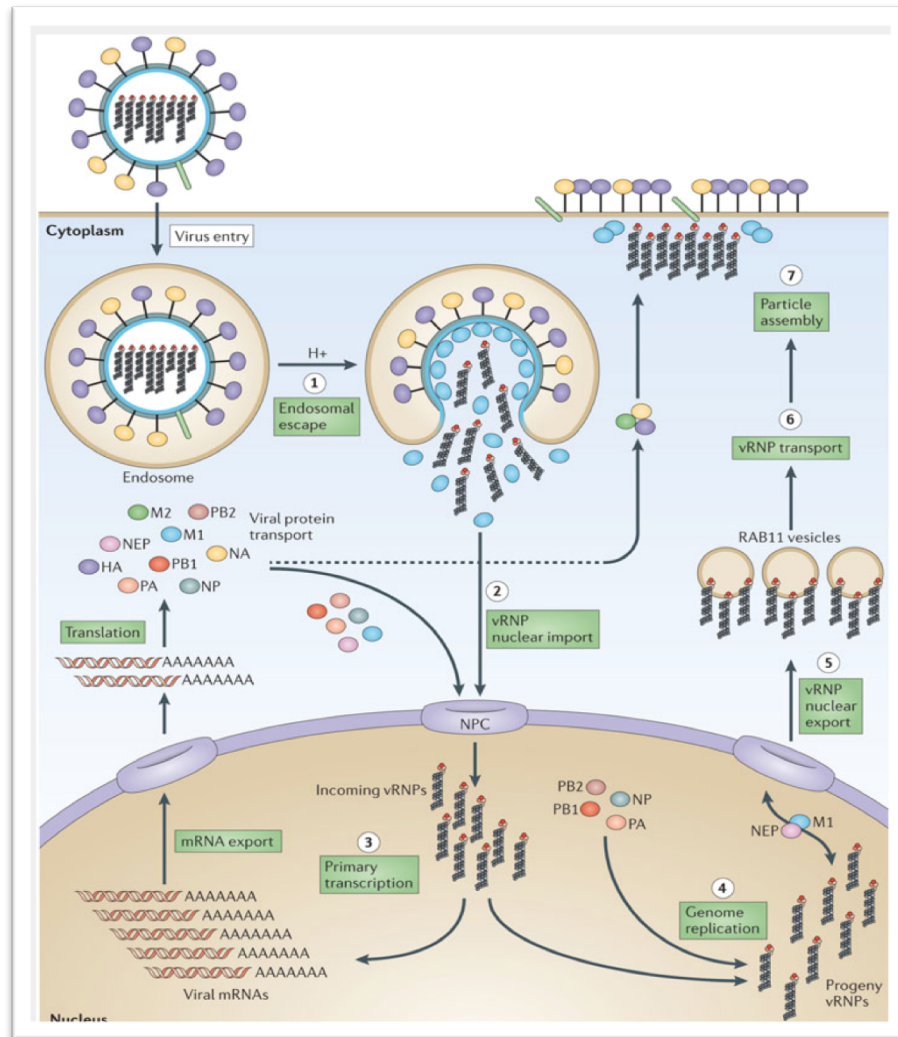
O ciclo replicativo do vírus desenvolve-se em várias etapas que podem ser identificadas da seguinte maneira: ligação ao ácido siálico, entrada na célula hospedeira e descapsidação da partícula viral (etapas iniciais); transcrição, tradução e replicação do genoma do vírus (síntese de macromoléculas). As etapas finais compreendem a morfogénese, libertação e maturação da partícula viral (Figura 5).

### 2.2.1. Etapas iniciais: ligação ao ácido siálico, entrada na célula hospedeira e descapsidação da partícula viral

O ciclo replicativo do vírus inicia-se com a ligação da HA aos recetores de ácido siálico, presente na membrana das células do trato respiratório do hospedeiro. Após esta ligação, a partícula viral entra na célula hospedeira por um mecanismo de endocitose mediada por moléculas de clatrina, originando um endossoma (Szewczyk et al., 2014), embora o vírus *Influenza A* também possa usar uma via endocítica não dependente da clatrina (Watanabe, Watanabe, & Kawaoka, 2010). O baixo pH (5-6) no interior dos endossomas permite alterações na conformação da HA levando a que o péptido de fusão HA2 seja exposto e inserido na membrana endossomal, ocorrendo

assim a fusão das duas membranas: endossomal e viral. Por outro lado, os canais iônicos M2, permitem o aumento do fluxo de prótons criando uma acidificação do interior da cápside viral, libertando a M1 do complexo RNP viral, que conseqüentemente são libertados no citoplasma da célula hospedeira (Figura 5; passo 1) (Samji, 2009), processo conhecido por descapsidação.

### 2.2.2. Síntese de macromoléculas: transcrição, tradução e replicação



**Figura 5. Ciclo replicativo do vírus *Influenza A*.** Encontram-se representadas as etapas precoces: ligação, entrada e descapsidação (1). (2) A importação nuclear do complexo RNP. (3) Transcrição primária do RNAv em mRNAV. Subseqüentemente ocorre a exportação deste mRNAV para o citoplasma onde será traduzido em proteínas virais, que posteriormente voltam a entrar no núcleo da célula hospedeira para integrarem na (4) replicação do genoma viral. (5) Exportação nuclear dos complexos RNPs recém-sintetizados. (6) Transporte dos complexos RNPs para a morfogênese (7) e libertação (não ilustrado) (Eisfeld et al., 2014).

A replicação e transcrição do genoma de RNA do vírus *Influenza A* ocorre no núcleo das células hospedeiras. Como tal os complexos de RNPs do vírus libertados no citoplasma da célula, necessitam de serem transportados para o interior do núcleo. A importação nuclear ocorre por um processo dependente de energia que envolve o reconhecimento de sinais de localização nuclear (NLSs), presentes na NP. Esse transporte é realizado através do complexo de poros nucleares da célula (NPC) (Eisfeld et al., 2014; Watanabe et al., 2010). Esta via clássica de importação é medida por proteínas adaptadoras  $IMP\alpha$ , que tipicamente reconhecem os NLSs, que por sua vez são reconhecidos pelo recetor de transporte  $IMP\beta$ . É sob a forma deste complexo  $IMP\alpha$ - $IMP\beta$ -RNP<sub>v</sub> que os complexos RNP<sub>sv</sub> atravessam o NPC entrando no núcleo da célula hospedeira (Figura 5; passo 2). Uma vez no interior do núcleo, o complexo  $IMP\alpha$ - $IMP\beta$ -RNP<sub>v</sub> é dissociado e libertado no nucleoplasma. As  $IMP\alpha$  e  $IMP\beta$  individualmente voltam ao citoplasma e os complexos RNP<sub>sv</sub> permanecem no núcleo para a posterior transcrição e replicação (Eisfeld et al., 2014).

Os mecanismos de transcrição e replicação viral são distintos (Martín-Benito & Ortín, 2013), embora ocorram ambos no mesmo complexo de polimerases virais, com distintas funções para cada subunidade. A transcrição é dependente de um *primer* e a replicação viral é um processo independente de *primer* (Resa-Infante, Jorba, Coloma, & Ortin, 2011; Zheng & Tao, 2013).

A transcrição é iniciada por *cap-snatching*, isto é, a clivagem de um fragmento com 10-13 nucleótidos a jusante da extremidade 5'-cap do pré-mRNAs do hospedeiro pela PA, originando assim o *primer*. A elongação da cadeia ocorre na PB1 e inicia-se com a adição do nucleótido guanina (G) ou citosina (C), complementar ao 2º ou 3º nucleótido do *template* de RNA<sub>v</sub>, à extremidade 3' do *primer*. Este processo continua até ao sinal de poliadenilação, uma extensão de 5-7 Uracilo (U), sintetizando assim a cauda poli(A) na extremidade 3' do RNA mensageiro viral (mRNA<sub>v</sub>) (Resa-Infante et al., 2011; Velthuis & Fodor, 2016; Zheng & Tao, 2013). Na transcrição o RNA<sub>v</sub> é então copiado num mRNA<sub>v</sub>, com a extremidade 5'- cap e a extremidade 3' poliadenilada (Figura 5; passo 3).

O mRNA<sub>v</sub> é exportado para o citoplasma para ser traduzido nos ribossomas celulares, dando origem às seguintes proteínas virais: HA, NA, M1, M2, NS1, NS2, NP, PB1, PB2 e a PA. Os últimos quatro componentes proteicos, que fazem parte do complexo RNP, são importados para o núcleo, para catalisar a replicação RNA<sub>v</sub>. Além disso, também as proteínas M1 e NS2 entram no núcleo para executarem o seu papel na exportação nuclear do complexo RNP<sub>v</sub> ou no processamento de exportação dos RNAs virais (Matsuoka et al., 2013; Velthuis & Fodor, 2016).

A replicação do RNA<sub>v</sub> ocorre em duas fases. Na primeira fase da replicação o RNA<sub>v</sub> é sintetizado num RNA de polaridade positiva, designado por RNA complementar (cRNA) (formando um complexo de RNP complementar (cRNP)). Na segunda fase, este cRNA é usado como *template* na síntese de novos RNA<sub>v</sub> (Figura 5; passo 4). A replicação inicia-se com a ligação da extremidade 3' do RNA<sub>v</sub> (*template*) à PB1 e adição de uma adenina (A) e uma G, complementares ao 1º e 2º nucleótido da extremidade 3' do *template*. Após a elongação da cadeia de cRNA, a extremidade 5' desta liga-se a um complexo de polimerases recém-sintetizadas e a restante cadeia associa-se com a NP, formando o complexo cRNP. Na segunda fase da replicação (cRNA → RNA<sub>v</sub>), a extremidade 3' do cRNA liga-se a PB1 e uma A e G emparelham com o 4º e 5º nucleotídeo, respetivamente, do *template*, continuando assim a elongação pela polimerase (Velthuis & Fodor, 2016). O processo finaliza-se com a extremidade 5' do novo RNA<sub>v</sub> sendo ligada a uma polimerase recém-sintetizada e a restante cadeia do RNA<sub>v</sub> associa-se com as NPs de modo a formar um novo complexo RNP do vírus (Velthuis & Fodor, 2016).

### 2.2.3. Etapas finais: morfogénese, libertação e maturação

Após a recente síntese do complexo RNP no núcleo das células hospedeiras, este é transferido para o citoplasma através de uma via de exportação nuclear da própria célula hospedeira, CRM1 (Samji, 2009; Watanabe et al., 2010). A exportação nuclear do complexo RNP do vírus requer a interação das proteínas virais NS2 e M1 (Matsuoka et al., 2013). Depois da ligação da M1 ao complexo RNP, as NS2 ligam-se ao domínio C-terminal do complexo M1/RNP (Watanabe et al., 2010). Por outro lado,

o NS2 forma uma ponte ligando todo este complexo ao CRM1. É através deste complexo designado por "*daisy-chain*", que o complexo RNP do vírus é exportado para o citoplasma (Figura 5; passo 5). Após o complexo RNP sair do núcleo, as últimas etapas do ciclo replicativo consistem na formação e libertação das novas partículas virais (Samji, 2009).

Nestas últimas fases do ciclo replicativo do vírus, os componentes do virião, incluindo o complexo RNP, a proteína da matriz M1 e as proteínas do invólucro viral, HA, NA e M2, são reunidos na zona apical da membrana plasmática nas células epiteliais, para que possa ocorrer a morfogénese do vírus e consecutiva libertação (Figura 5; passo 7) (Watanabe et al., 2010). A morfogénese dos componentes virais ocorre preferencialmente nos *rafts* lipídicos. As vesículas contendo os complexos RNPs sofrem transporte mediado por RAB11, que as conduzem até ao local da morfogénese (Figura 5, passo 6). As glicoproteínas HA e NA são incorporadas nestes *rafts*, mas não sem antes sofrerem modificações pós-tradução, etapa designada por maturação. Estas modificações ocorrem no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. No retículo endoplasmático estas proteínas são glicosiladas e adquirem a sua forma correta (HA em trímeros e NA em tetrâmeros). No complexo de Golgi dá-se a esterificação com ácidos gordos. Os sinais para a associação destas glicoproteínas aos *rafts* lipídicos localizam-se nos seus domínios transmembranares (Szewczyk et al., 2014).

Uma vez que o vírus *Influenza A* é um vírus com invólucro, ele usa a própria membrana plasmática da célula hospedeira para criar o invólucro (Samji, 2009). A HA liga o vírus à membrana celular devido, mais uma vez, à sua afinidade com os recetores do ácido siálico. Posteriormente a NA cliva esta ligação de modo a permitir que o vírus se liberte da célula hospedeira (Szewczyk et al., 2014). No entanto, para o vírus adquirir a sua forma infecciosa é necessário que a HA sofra uma nova modificação pós-tradução. Esta maturação, requer a ação de uma endoprotease que cliva num local específico (normalmente codificado pelo aminoácido arginina) entre os domínios HA1 e HA2, produzindo assim a forma madura das subunidades proteicas, necessárias para a ligação e entrada da partícula viral na célula hospedeira (Taubenberger, 1998). Curiosamente o tempo desde a ligação do vírus à produção de novas partículas virais ocorre em cerca de 6 horas (Gurtler, 2006).

### 3. Das aves aquáticas aos seres humanos – Origem da diversidade do vírus *Influenza A*

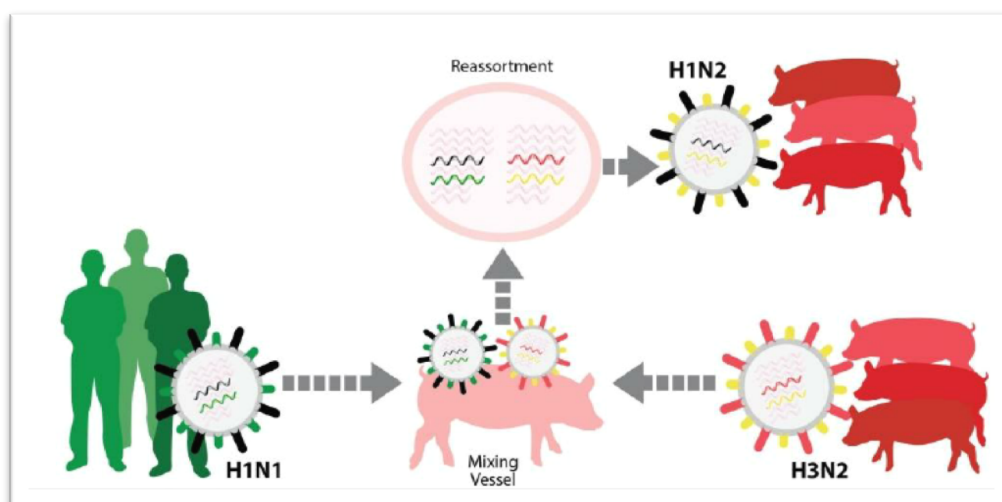
Em 1878 no norte de Itália, Eduardo Perroncito observou em aves domésticas, uma doença infecciosa e de fácil transmissão, que levou à morte todas as aves domésticas da região. O agente causal foi identificado em 1955 e provou-se ser o vírus *Influenza* (Wahlgren, 2011).

O vírus *Influenza A*, quando presente no seu nicho ecológico também designado por reservatório natural – aves aquáticas e aves domésticas – é uma infecção benigna (Taubenberger & Kash, 2010; Wahlgren, 2011). No entanto, este é um vírus muito variável e por isso capaz de infetar e adaptar-se a um grande número de animais de sangue quente, incluindo suínos e equinos, considerados como hospedeiros intermediários (Mackenzie et al., 2014) e por fim os seres humanos (Taubenberger & Morens, 2008). A existência de hospedeiros intermediários foi sugerida como veículo de transmissão do vírus até aos seres humanos. Assim, um cenário de transmissão proposto pode seguir a seguinte sequência: aves aquáticas selvagens  $\Rightarrow$  aves aquáticas domésticas  $\Rightarrow$  suínos  $\Rightarrow$  seres humanos (Salomon & Webster, 2009). Os vírus *Influenza A* ao adaptarem-se a hospedeiros podem originar novas variantes (ou linhagens) em novos hospedeiros. Tais mudanças são facilitadas quando várias espécies de aves e mamíferos se encontram albergadas em estreita proximidade, por exemplo nos mercados de animais vivos (Salomon & Webster, 2009).

A capacidade de diversidade genética que o vírus *Influenza A* apresenta, resulta de mecanismos que se enquadram em duas categorias designadas por *shift* antigénico e *drift* antigénico (Sandbulte, Spickler, Zaabel, & Roth, 2015).

O *shift* antigénico resulta na introdução de novos subtipos virais na população humana provocando pandemias na população *naïve*, ou seja, quando a maioria da população não apresenta imunidade para as novas variantes do vírus (Forleo-Neto, Halker, Jorge Santos, Maria Paiva, & Toniolo-Neto, 2003) e estas são assim eficazmente transmitidas entre os seres humanos (Sandt et al., 2012), afetando todas

as faixas etárias (Forleo-Neto et al., 2003). A forma principal de *shift* antigénico é denominada por *reassortment* genético, e é consequência da presença dos oito segmentos do genoma do vírus (Sandbulte et al., 2015). Esta é a base da alta frequência de *reassortment* de genes em células que são duplamente infetadas (Resa-Infante et al., 2011), possibilitando assim uma permuta destes segmentos genéticos entre dois ou mais subtipos do vírus *Influenza* que infetam a mesma célula (Figura 6). Como consequência são formados novos vírus que expressam novas combinações proteicas, incluindo variantes que expressam novas glicoproteínas de superfície, uma nova HA, uma nova NA, ou mesmo ambas (Sandbulte et al., 2015). Assim, quando o vírus *Influenza A* é introduzido na população humana após um evento de *shift* antigénico, pode escapar completamente à imunidade pré-existente na população hospedeira criando condições para uma pandemia (Sandbulte et al., 2015; Taubenberger & Morens, 2008). O mecanismo de *reassortment* ocorre nos três subtipos do vírus *Influenza*: A (com mais frequência), B e C (sendo raro para este último), contudo ainda não foi observado entre eles (Amato Gauci AJ et al., 2010).

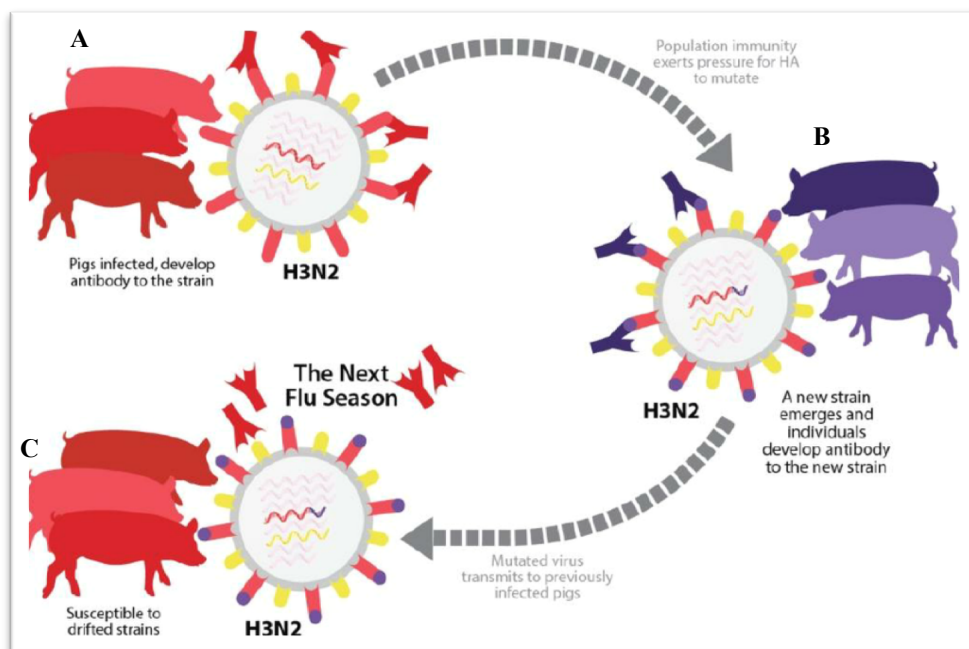


**Figura 6. Mecanismo de *shift* antigénico.** O *reassortment* genético, que ocorre no suíno quando este é infetado por duas variantes. H1N1 e H3N2. Após o *reassortment* forma-se o novo subtipo H1N1 (Sandbulte et al., 2015).

O *drift* antigénico é um outro mecanismo de variabilidade do vírus *Influenza A* (Figura 7). Este mecanismo consiste, na acumulação gradual de mutações pontuais nos

segmentos do genoma do vírus, durante o processo de replicação, originando mudanças de aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície (Forleo-Neto et al., 2003), principalmente na região altamente variável da HA1 (Figura 3) (Sandt, Kreijtz, & Rimmelzwaan, 2012).

Estas mutações ocorrem devido à inexistência da capacidade de *proofreading* da RNA polimerase do vírus (Amato Gauci AJ et al., 2010), estando assim propensa a uma taxa elevada de erros calculada em aproximadamente  $10^{-5}$  (Schmolke & García-Sastre, 2010). Estas mutações podem levar a que o vírus *Influenza A* escape ao reconhecimento dos anticorpos neutralizantes do hospedeiro, resultando em surtos sazonais epidêmicos (Sandt et al., 2012). Estas variações ocorrem a cada dois ou três anos (Forleo-Neto et al., 2003).



**Figura 7. Mecanismo de *drift* antigênico.** Ao longo do tempo mutações aleatórias nos genes HA e NA do vírus *Influenza A* nos suínos podem causar alterações significativas nas suas propriedades antigénicas. Em **A**, os suínos possuem anticorpos neutralizantes para a estirpe H3N2. Em **B**, através do mecanismo de *drift* antigénico é produzido uma nova variante. Em **C**, os suínos infetados com a nova variante do vírus, sendo os seus anticorpos pré-existent incapazes de neutralizar esta nova variante, tornando-os suscetíveis a uma reinfeção (Sandbulte et al., 2015)

#### **4. Epidemiologia do vírus *Influenza A* numa perspetiva histórica e contemporânea**

À medida que as viagens globais aumentam, a transmissão de agentes patogénicos também aumenta. Atualmente, nenhuma ameaça biológica é mais plausível do que a de surtos de gripe pandémica. O esforço global para controlar a gripe através da vacinação expandiu-se continuamente desde a pandemia de 1918-1919, que causou a morte a cerca de 20 milhões de pessoas em todo o mundo e mais de meio milhão só nos Estados Unidos (Liu, 1994). A pandemia de gripe mais recente, em 2009, mostrou não ser tão severa como inicialmente se temia, mas o rápido surgimento e disseminação mundial do vírus *Influenza A* levou a uma crítica reavaliação por parte da Organização Mundial de Saúde (OMS), políticos e investigadores, de modo adequar as capacidades de lidar com tais surtos (Han & Marasco, 2011).

Em fevereiro de 2014, a OMS clarificou os conceitos em relação às diferenças entre gripe sazonal, pandemias e *Influenza* zoonótica ou variante. Segundo esta organização, a gripe sazonal define-se por: vírus *Influenza* que circulam e causam doenças em seres humanos todos os anos. Nos países com climas temperados, a doença tende a ocorrer sazonalmente nos meses de inverno, transmitindo-se de pessoa para pessoa através de espirros, tosse ou simplesmente pelo toque em superfícies contaminadas. Podem causar doenças simples a graves ou até mesmo levar a morte, particularmente em indivíduos ditos como de alto risco, por exemplo, mulheres grávidas, crianças ou idosos, imuno-comprometidos e em pessoas com doenças respiratórias crónicas subjacentes. Uma outra característica do vírus *Influenza* sazonal é a sua contínua evolução. Por conseguinte, os componentes das vacinas contra a gripe sazonal são revistos bianualmente e atualizados periodicamente para garantir uma contínua eficácia das vacinas (World Health Organization, 2014). Apesar dos sucessos das estratégias de vacinação profilática que foram implementadas para reduzir a taxa de morbidade nas últimas décadas, as epidemias sazonais de gripe ainda causam elevada morbidade e mortalidade, resultando na morte de 250.000 a 500.000 pessoas por ano a nível mundial (Han & Marasco, 2011). Existem três grandes tipos de vírus

*Influenza* sazonal, A (subtipo H1N1 e H3N2), B (linhagens *Victoria* e *Yamagata*) e C (provoca infecções mais suaves, está associada a casos esporádicos e a surtos menores). Apenas o tipo A e B estão incluídos no plano de vacinação contra a gripe (World Health Organization, 2014).

As pandemias ocorrem quando um vírus *Influenza*, que não circulava anteriormente entre os seres humanos e para o qual a maioria das pessoas não têm imunidade, emerge. Além disso, são transmissíveis entre os seres humanos e a proporção de pessoas infetadas numa população é bastante grande. Este vírus pode surgir, circular e causar grandes surtos fora da época típica de atividade gripal. Podem resultar em infecções graves ou moderadas, embora as razões por detrás desta diferença não estejam completamente compreendidas (World Health Organization, 2014) .

O *Influenza* zoonótico ou variante, é a infeção nos seres humanos, com vírus *Influenza* que circule rotineiramente em animais, como por exemplo os subtipos A(H5N1) e A(H9N2) do vírus *Influenza* das aves e os subtipos A(H1N1) e A(H3N2) do vírus *Influenza* dos suínos. As infecções humanas da gripe zoonótica são adquiridas através do contacto direto com animais infetados ou ambientes contaminados, não tendo uma grande disseminação entre os seres humanos. No entanto se o vírus adquirir a capacidade de se transmitir facilmente entre os seres humanos através da adaptação ou da aquisição de certos genes de vírus humanos, poderá iniciar uma epidemia ou uma pandemia (World Health Organization, 2014).

Ao longo da história as pandemias provocadas pelo vírus *Influenza A*, têm vindo atingir as sociedades humanas e por vezes com resultados devastadores (Rhedin et al., 2012). Assim, surtos de gripe nos seres humanos são relatados a partir do final da Idade Média na Europa e Grã-Bretanha. Foi sugerido que a gripe fora introduzida na América pela segunda viagem de Cristóvão Colombo em 1492, causando centenas de milhares de mortes na população indígena da ilha Hispaniola. Embora isto fosse questionado, parece provável que a gripe tenha contribuído para o despovoamento de comunidades remotas, imunologicamente naïve, incluindo a Polinésia Francesa (Mackenzie et al., 2014).

A primeira pandemia do século XVIII começou na primavera de 1729 na Rússia, espalhando-se por toda a Europa nos seis meses seguintes e pelo resto do mundo em três anos. A segunda pandemia desse século parece ter começado na China no outono de 1781, espalhando-se pela Rússia e Europa ao longo de um período de

oito meses, com uma taxa de incidência particularmente alta entre os jovens adultos. A grande pandemia do século XIX teve início no inverno de 1830 na China, difundindo-se através do Sudeste Asiático, da Rússia, e da Europa, e na América do Norte em 1831. No inverno de 1889, outra pandemia surgiu na Rússia, espalhando-se por via-férrea e marítima a toda a Europa e América do Norte. O surto matou cerca de um milhão de pessoas em todo o mundo. Esta pandemia espalhou-se a um ritmo mais rápido do que as anteriores, e pode fornecer a primeira indicação da propagação acelerada de doenças emergentes como resultado do progresso na tecnologia de transporte (Saunders-Hastings & Krewski, 2016).

Em 1918 emerge uma pandemia provocada pelo vírus *Influenza A*, designada por “Gripe Espanhola”, que coincidiu com o fim da I Guerra Mundial. Em poucos meses tornou-se responsável por mais mortes do que as verificadas durante os 4 anos de guerra (20-50 milhões de mortes). Este quadro devastador poderá ter sido influenciado pelas condições de aquartelamento dos soldados e a respetiva exposição a gases tóxicos (Mackenzie et al., 2014; Sandt et al., 2012; World Health Organization, 2014). A caracterização do vírus pandémico de 1918, atualmente conhecido como sendo o subtipo H1N1 do vírus *Influenza A*, foi apenas iniciada em 1995. Obter a sequência completa do genoma e depois reconstruí-la em laboratório, sob uma vertente arqueo-viológica, levou cerca de uma década. Assim, foram extraídos pequenos fragmentos do RNA dos tecidos pulmonares preservados das vítimas, amplificados por reação em cadeia da polimerase antecedida de transcrição reversa (RT-PCR), e posteriormente sequenciadas (Taubenberger & Morens, 2010). Constatou-se que o subtipo H1N1 que provocou a gripe dita “Espanhola” apresenta semelhanças à estirpe do vírus presente nas aves e alguns dos seus genes foram derivados de vírus de mamíferos que circulam desde 1911 (Figura 8) (Neumann, Noda, & Kawaoka, 2009; Sorrell et al., 2011).

Em fevereiro de 1957, uma nova estirpe do vírus *Influenza A*, o H2N2, foi detetado na província de Yunnan, na China. Esta pandemia, também designada por “Gripe Asiática”, disseminou-se principalmente por via terrestre e por rotas marítimas (Sandt et al., 2012). Em março e nos seguintes meses foi detetado em Singapura, Hong Kong, Japão, chegando ao Reino Unido e aos Estados Unidos de América em outubro. Esta pandemia foi causada por um *reassortment* entre o subtipo H1N1 humano, que

circulava sazonalmente e o subtipo H2N2 do vírus das aves. Resultando na introdução dos genes H2, N2 e PB1 do vírus das aves nas populações humanas (Figura 8) (Neumann et al., 2009; Sorrell et al., 2011).

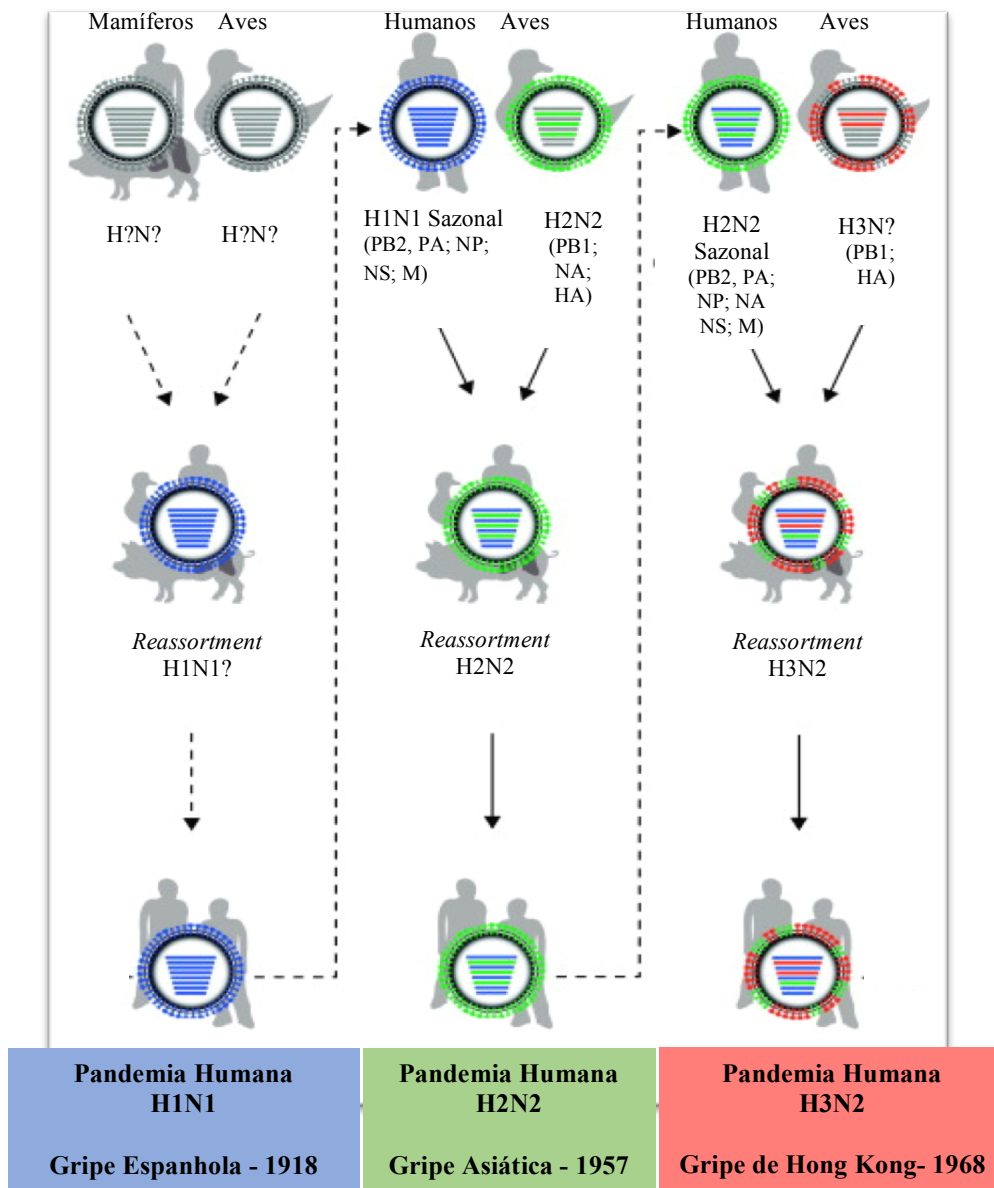
Passados dez anos, a estirpe que causou a pandemia da “Gripe Asiática”, o H2N2, sofre uma mudança antigénica resultante do *shift* antigénico. Este vírus sofreu um outro *reassortment* entre as estirpes humanas / aviárias. O gene HA e PB1 do vírus H2N2 humano foram substituídos pelo gene H3 e pelo gene PB1 do vírus das aves, originando um novo subtipo, o H3N2, que emergiu como uma nova pandemia conhecida por “Gripe de Hong Kong” em 1968 (Figura 8) (Saunders-Hastings & Krewski, 2016; Sorrell et al., 2011).

Em maio de 1977, um surto do vírus *Influenza A* foi relatado na China afetando jovens adultos e em novembro é detetada na Rússia sendo posteriormente conhecida por “Gripe Russa”, “Gripe Vermelha” ou “*Influenza Vermelha*” (Kilbourne, 2006). Este surto foi causado pelo subtipo H1N1 que se assemelha ao subtipo que circulava no início da década de 1950. O seu reaparecimento deveu-se à libertação acidental deste vírus. Passou assim a existir a co-circulação, até aos dias de hoje, das duas variantes, H3N2 e o H1N1 nos seres humanos. O *reassortment* entre estes dois subtipos originou a emergência em 2001 do H1N2 na população humana, e que no mesmo ano desapareceu (Neumann et al., 2009).

Decorria o ano de 1997 quando surgem os primeiros relatos em Hong Kong, de 18 indivíduos infetados (6 morreram) por um subtipo altamente patogénico, o H5N1, proveniente do vírus *Influenza* das aves, conhecido também pela “Gripe das Aves”. Após um período de surtos locais e esporádicos, em 2003 um novo surto começou e o vírus H5N1 desde então espalhou-se pelos continentes Europeu e Africano e tornou-se enzoótico em aves domésticas na Ásia. Este vírus, altamente patogénico possui características notáveis, como por exemplo: são letais não só em aves domésticas como também em aves aquáticas (reservatório natural do vírus *Influenza A*); são capazes de infetar letalmente e de se replicarem em ratos; infetam várias espécies de mamíferos provocando a morte; a patogenicidade em furões tem vindo a aumentar ao longo dos anos, o que indica a aquisição de mutações que consequentemente aumentam a sua virulência (ou patogenicidade) nas diferentes

espécies de mamíferos; mais preocupante ainda é a sua contínua transmissão das aves aos humanos que resulta em infecções respiratórias graves com elevadas taxas de mortalidade (Neumann et al., 2009).

Em abril de 2009 registaram-se surtos do subtipo H1N1 do vírus *Influenza A*, quase simultaneamente no México e nos Estados Unidos e em poucas semanas, a doença espalhou-se por mais de 30 países. Em junho de 2009, a OMS declarou uma pandemia global da gripe, provocada pelo vírus H1N1, também conhecida por “Gripe Suína”, “Gripe Mexicana” ou “Gripe Nova” (Mackenzie et al., 2014; Saunders-Hastings & Krewski, 2016). Este vírus, designado como vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) (A(H1N1)pdm09), disseminou-se rapidamente por todo o mundo a partir desse ano (World Health Organization, 2014), consequência da extensão global de comércio e de viagens. Em julho desse mesmo ano, a infecção foi relatada em 122 países, com 134.000 casos confirmados laboratorialmente e 800 mortes (Saunders-Hastings & Krewski, 2016). Atualmente encontra-se estabelecido na população humana como um vírus de gripe sazonal (World Health Organization, 2014).



**Figura 8. Reassortment das principais pandemias do vírus *Influenza A* do século XX.** Em 1918 a “Gripe Espanhola”, subtipo H1N1, resulta de um *reassortment* entre o vírus das aves e dos mamíferos. Após 1918, o subtipo H1N1 causou epidemias sazonais até 1957, quando o subtipo H2N2 emerge como “Gripe Asiática”, após um *reassortment* entre o H1N1 e o H2N2 das aves, introduzindo os genes PB1, NA e HA presente nas aves. Este vírus circulou nos humanos até ao surgimento de uma nova pandemia em 1968 a “Gripe de Hong Kong”, causada pelo *reassortment* do H2N2 com um vírus H3 das aves, resultando na troca dos segmentos genómicos HA e PB1 formando o subtipo H3N2. Adaptação de Sorrell et al., 2011.

## 5. O vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1)

### 5.1. A primeira pandemia do século XXI – no Mundo, Europa e em Portugal

Há anos que se esperava a emergência de um novo vírus *Influenza A* no homem, proveniente da adaptação de vírus zoótico. No inverno de 2009 diversos países foram fustigados pelo aparecimento de uma nova pandemia viral (Carneiro, Trench, Waib, Pedro, & Motta, 2010).

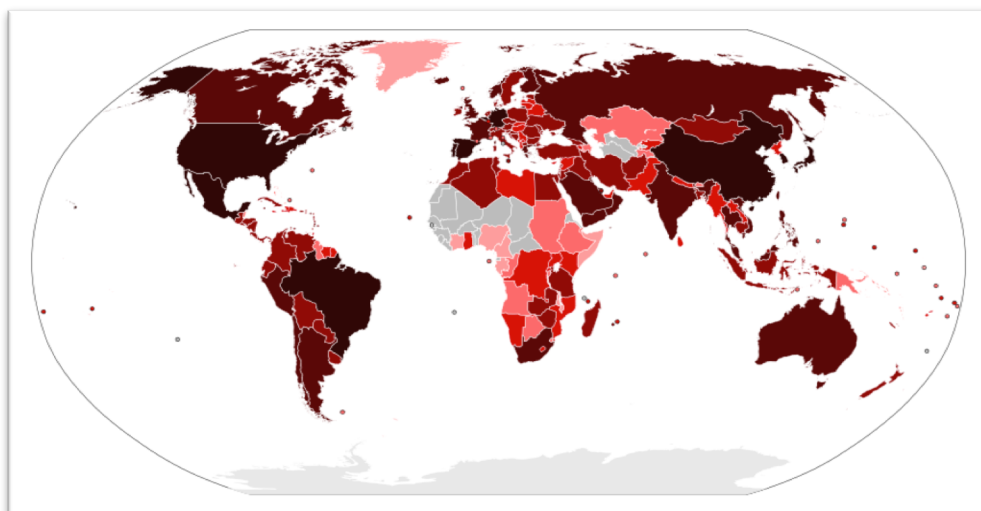
A OMS comunica a 11 de junho de 2009, o surgimento de uma nova estirpe do vírus *Influenza A*, o H1N1, identificado como A/Califórnia/4/2009(H1N1) (George et al., 2010), que anteriormente não havia circulado entre os seres humanos. Esta organização refere-se a este vírus como contagioso, espalhando-se facilmente de uma pessoa para outra e de um país para outro. Afirmando que “*O mundo está agora no início de uma pandemia da gripe de 2009*”, com cerca de 30 mil casos confirmados em 74 países. Algumas características epidemiológicas da pandemia, incluindo a distribuição de idades, diferem da gripe sazonal. Na gripe sazonal, as crianças jovens e idosos são mais vulneráveis e a taxa de mortalidade é maior no extremo dos grupos etários. No entanto, na gripe pandémica que ocorre num ciclo de 10 a 40 anos, os indivíduos de todas as idades sem imunidade podem ser afetados (Rhim et al., 2012). Segundo a OMS, o vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) infeta preferencialmente pessoas mais jovem, onde uma pequena percentagem evoluiu para infeções graves, muitas vezes com uma progressão rápida para pneumonias fatais. A maioria dos casos de infeções graves e fatais ocorreu em adultos entre 30 e 50 anos, com condições crónicas subjacentes, como por exemplo, doenças respiratórias, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças auto-imunes e obesidade. Por outro lado, cerca de um terço a metade destas infeções graves e fatais estavam a ocorrer em pessoas previamente saudáveis, estando as grávidas em maior risco de complicações («WHO | World now at the start of 2009 influenza pandemic», 2009).


Os primeiros eventos da pandemia provocada por vírus do subtipo H1N1, surgiram na localidade de La Gloria, Veracruz, no México, onde um número incomum

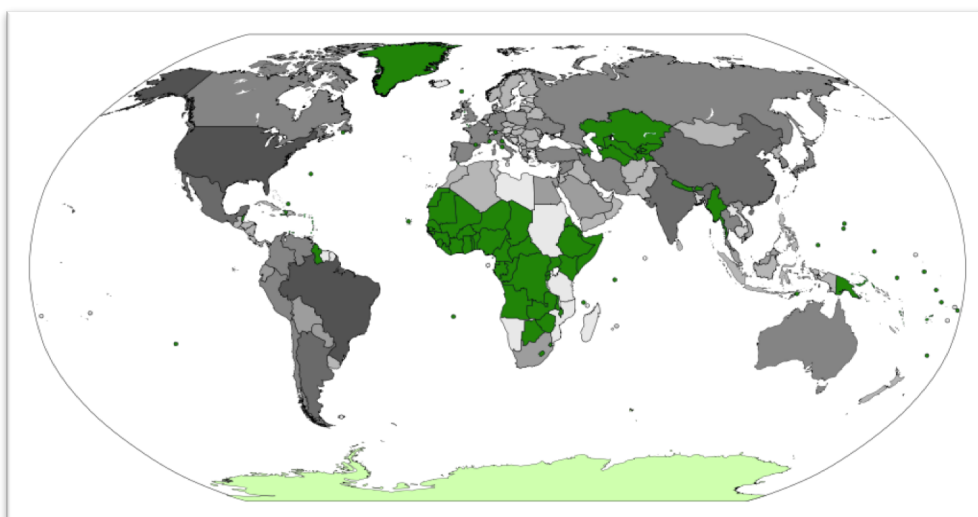
de casos de síndrome gripal foi relatado no início de março de 2009. A 12 de abril, a OMS solicitou ao governo mexicano que analisasse qual o agente etiológico responsável pelos surtos de infecções respiratórias agudas. Nove dias depois foram enviadas amostras para o Laboratório Nacional de Microbiologia da Agência de Saúde Pública do Canadá e ao departamento de *Influenza* dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos. Quase em simultâneo, o CDC que estudava duas amostras de crianças da Califórnia, conclui que o agente etiológico era um novo subtipo do vírus de *Influenza A*, o H1N1 de origem suína. Mas só a 24 de abril, o NML e o CDC confirmam a presença do mesmo vírus nas amostras do México, o que sugere uma transmissão entre os humanos. A 26 e 27 de abril, surgem os dois primeiros países, Canadá e Espanha, fora dos EUA e do México, com casos confirmados de gripe provocados pelo subtipo H1N1. Um dos primeiros eventos do surto no Canadá ocorreu num grupo de estudantes que viajaram para o México durante as suas férias. O vírus foi disseminado rapidamente a outras partes do mundo (Figura 10). No fim de abril e início de maio, Nova Zelândia, Israel, Reino Unido, Áustria, Alemanha, Holanda, Suíça, Hong Kong e Coreia já haviam confirmado a presença do H1N1 na sua população (Juno, Fowke, & Keynan, 2011). No final do ano quase todos os países do mundo haviam confirmado casos de gripe provocados pelo novo vírus A(H1N1)pdm09, com mortes associadas (Figura 9.)


Na Europa, a introdução do vírus fez-se por passageiros que viajavam do México (Guiomar et al., 2012). A 27 de abril de 2009, Espanha informou oficialmente o primeiro caso confirmado em laboratório da nova infeção pelo A(H1N1)pdm09, num passageiro que regressava do México, o Reino Unido foi o segundo país a reportar dois casos em situação semelhante. No prosseguimento destes casos iniciais oriundos da América do Norte para a Europa, uma onda de transmissão na primavera/ verão foi evidente, atingindo a maioria dos países da União Europeia (UE), mas principalmente o Reino Unido (Amato Gauci AJ et al., 2010). Em julho de 2009, 13% dos casos notificados na UE haviam sido importados (relacionados com viagens) (Correia, Queirós, & Dias, 2010). À medida que o verão prosseguia a taxa de transmissão diminuiu ligeiramente e com a chegada do outono esta onda de transmissão volta a aumentar estabelecendo-se por todos os países da Europa (Figura 11) (Amato Gauci AJ et al., 2010).

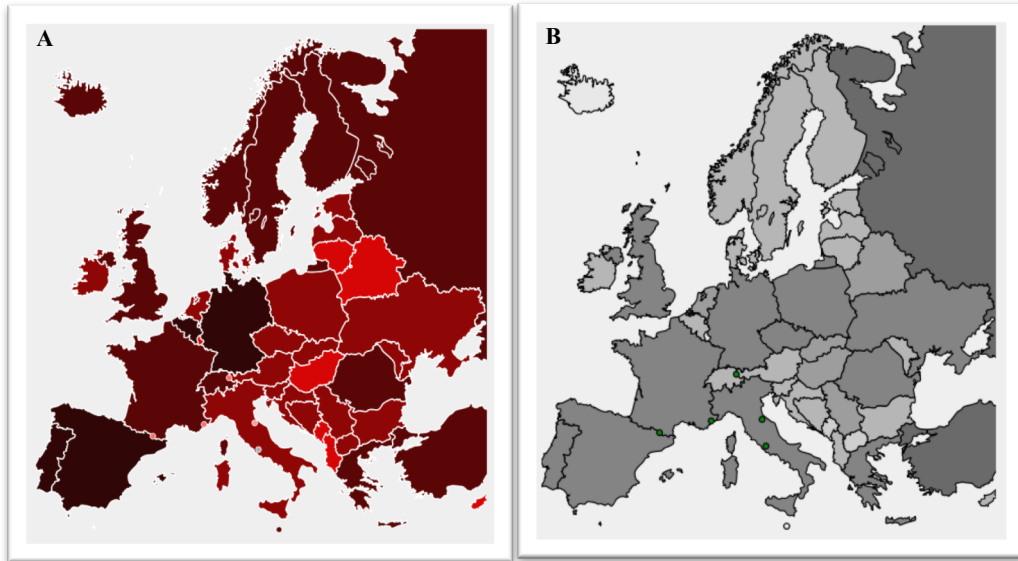
Portugal foi o 11º país a confirmar o primeiro caso de gripe provocado por esse agente etiológico («2009 flu pandemic in Portugal», 2017). A 29 de abril de 2009, foi reportado um caso positivo para o vírus H1N1, numa mulher jovem saudável com ligação epidemiológica confirmada a Cancun – México (Duque et al., 2010). A 29 de maio, surgiram 13 novos casos em Portugal, detetados em indivíduos que regressavam de viagem das áreas afetadas pelo novo vírus. A 14 de julho haviam sido declarados os primeiros 100 casos dos quais 16 não se relacionavam com viagens e durante o mês de agosto a transmissão entre a população autóctone esteve na origem da maioria dos casos (Correia et al., 2010). A 23 de setembro surge a primeira morte e a 4 de dezembro eram já 121.677 casos e 24 mortes confirmadas pelo vírus («2009 flu pandemic in Portugal», 2017). No período de 24 de abril a 21 de agosto, verificou-se que o Algarve era a região mais atingida pela atividade gripal, sendo responsável por 41% dos casos, seguido pela região de Lisboa e Vale do Tejo (LVT), Norte, Centro do país, Açores, Alentejo e por fim a Ilha da Madeira, a zona menos atingida pela atividade viral com menos de 2,5% dos casos (Figura 12) (George et al., 2010).





**Figura 10. Mapa do mundo de casos confirmados pelo vírus A(H1N1)pdm09.** A 21 de dezembro de 2009, a maioria dos países no mundo apresentavam casos confirmados para o vírus da gripe, à exceção dos países que se encontram de cor cinza. A escala de cor  refere-se ao número de casos confirmados pelos diferentes país do mundo com: mais de 50 000 casos; mais de 5 000 casos; mais de 500 casos; mais de 50 casos; mais de 5 casos e mais de 1 caso, respetivamente (do tom mais escuro para o tom mais claro) («File:H1N1 map by confirmed cases.svg»).

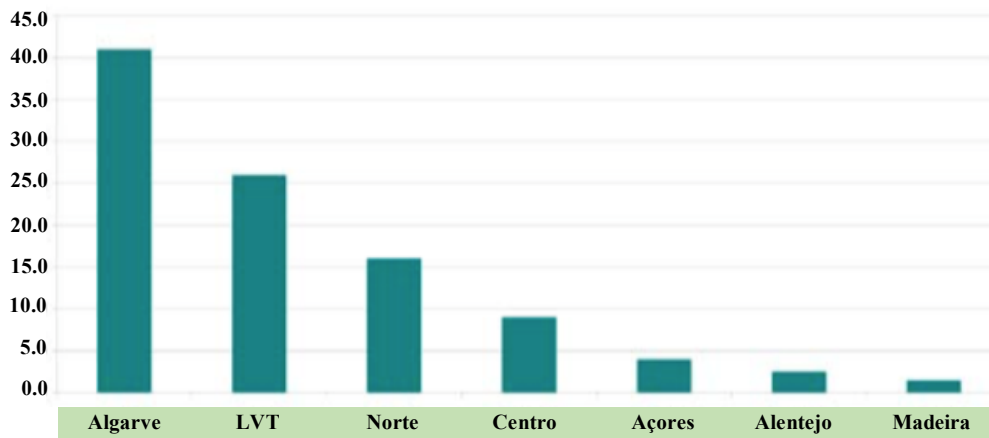


**Figura 9. Mapa do mundo referente ao número de morte confirmadas pelo vírus A(H1N1)pdm09.** A 21 de dezembro de 2009, a maioria dos países no mundo relatavam mortes confirmadas pelo vírus da gripe, à exceção dos países que se encontram a verdes no mapa. A escala de cor  refere-se ao número de mortes confirmadas nos diferentes países do mundo, respetivamente (do tom mais escuro ao mais claro): mais de 5000 mortes; mais de 1000 mortes; mais de 500 mortes; mais de 100 mortes; mais de 50 mortes; mais de 10 mortes; mais de 5 mortes e mais de 1 morte («File:H1N1 map by confirmed deaths.svg»).



**Figura 11. Disseminação do vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)*** **A. Mapa da Europa de casos confirmados pelo vírus A(H1N1)pdm09.** A 27 de maio de 2009, todos os países da Europa apresentavam casos confirmados para o vírus da gripe, à exceção da Cidade do Vaticano sem nenhum caso confirmado (ponto cinza no mapa). A escala de cor  refere-se ao número de casos confirmados na Europa por país com: mais de 50 000 casos; mais de 5 000 casos; mais de 500 casos; mais de 50 casos; mais de 5 casos e mais de 1 caso, respetivamente (do tom mais escuro para o tom mais claro) («Pandemia de gripe A de 2009 na Europa», 2016).

**B. Mapa da Europa referente ao número de mortes confirmadas pelo vírus A(H1N1)pdm09.** A 9 de novembro de 2009, todos os países da Europa mostravam mortes confirmadas pelo vírus da gripe, à exceção de Andorra, Mônaco, Cidade do Vaticano, San Marino e Liechtenstein (pontos verdes no mapa). A escala de cor  refere-se ao número de mortes confirmadas nos diferentes países da Europa, respetivamente (do tom mais escuro ao mais claro): mais de 5000 mortes; mais de 1000 mortes; mais de 500 mortes; mais de 100 mortes; mais de 50 mortes; mais de 10 mortes; mais de 5 mortes e mais de 1 morte («Pandemia de gripe A de 2009 na Europa», 2016).



**Figura 12.** Distribuição em Portugal dos casos do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1). O gráfico representa a distribuição percentual dos casos de A(H1N1)pdm09 em Portugal no período de 24 abril e 21 de agosto de 2009 (George et al., 2010).

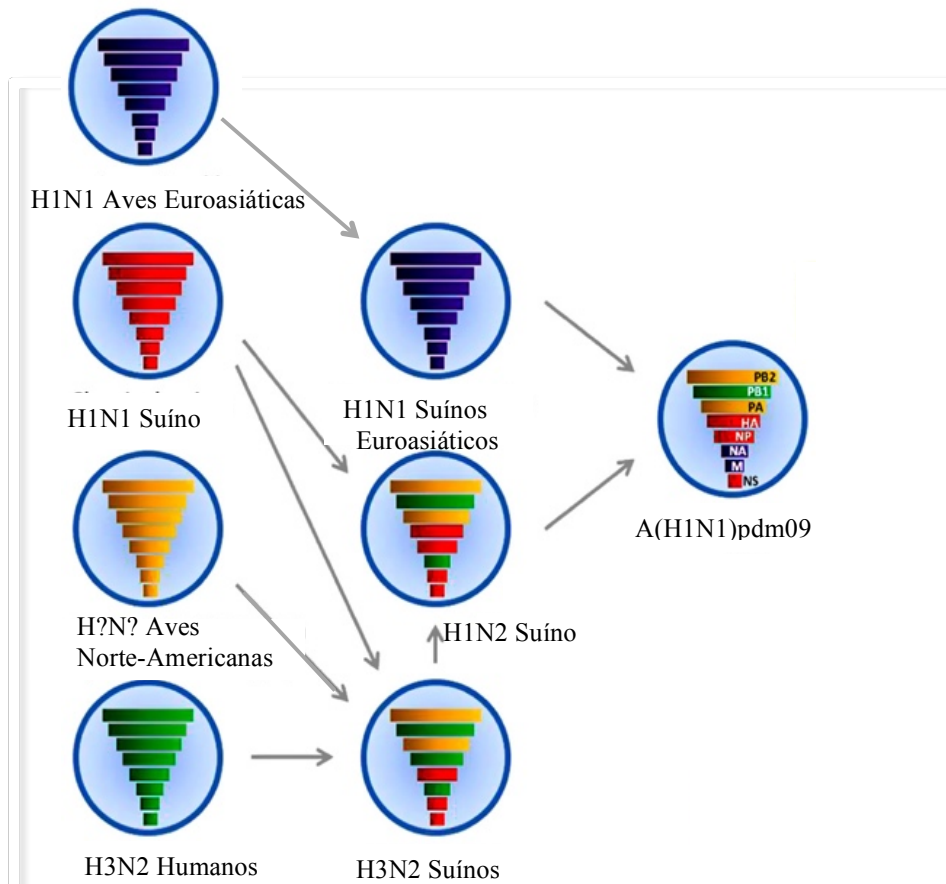
## 5.2. O triplo reassortment do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) na emergência da pandemia.

Sabe-se que a infeção simultânea de uma única célula por dois subtipos do vírus *Influenza A* distintos pode levar a um *reassortment* de genes, da qual pode resultar a formação de um novo subtipo do vírus *Influenza A*. Acredita-se que a maioria dos vírus *Influenza A* que causam pandemias nos seres humanos tenham surgido desta maneira (Obuchi, Adachi, Takizawa, & Sata, 2013). O vírus pandémico *Influenza A* (H1N1), que emergiu em 2009, é um novo subtipo do vírus *Influenza A* que afeta os seres humanos (Mpolya et al., 2009), tendo a sua origem nos suínos (Neumann et al., 2009).

No fim da década de 90, dois subtipos do vírus *Influenza A* emergem nos suínos, o H3N2 e o H1N2, resultado de um triplo *reassortment* entre os segmentos

genômicos dos vírus *Influenza A* que infetam as aves Norte-americanas, os humanos e os suínos (Obuchi et al., 2013).

Em 2009, no final do mês de abril, foram publicadas as primeiras sequências completas do genoma do vírus A(H1N1)pdm09, mostrando combinações de segmentos de genes, nunca antes relatados, em vírus *Influenza* nos suínos ou nos humanos (Gibbs, Armstrong, & Downie, 2009; Mpolya et al., 2009; Obuchi et al., 2013), consequência de um novo *reassortment* entre o subtipo H1N2 presente nos suínos e o subtipo H1N1 dos suínos euroasiáticos (Obuchi et al., 2013). Assim, o vírus A(H1N1)pdm09, resultado do *reassortment* genômico, é composto por: dois segmentos genômicos de origem aviária Norte-Americanas (subtipo desconhecido), o PB2 e o PA; um segmento do gene PB1 de origem humana (subtipo H3N2); três segmentos dos genes HA, NP e NS de origem suína (subtipo H1N1) e por fim os outros dois segmentos genômicos, o NA e o M derivados dos suínos euroasiáticos (subtipo H1N1) (Figura 13) (Obuchi et al., 2013; Tscherne & García-Sastre, 2011).



**Figura 13. Origem do vírus pandêmico 2009 *Influenza A* (H1N1).** *Reassortment* na origem do vírus pandêmico 2009 *Influenza A* (H1N1), emergência do subtipo H3N2 e H1N2 nos suínos como consequência do *reassortment* genômico, entre os subtipos H1N1 suíno; subtipo desconhecido (H?N?) das aves Norte-Americanas e o subtipo H3N2 humano. Em 2009 um novo *reassortment* entre o subtipo H1N2 dos suínos e o subtipo H1N1 dos suínos Euroasiáticos faz emergir o vírus pandêmico 2009 *Influenza A* (H1N1). Adaptação de Obuchi et al., 2013.

## **6. Métodos de diagnóstico laboratorial do vírus *Influenza* no ser humano**

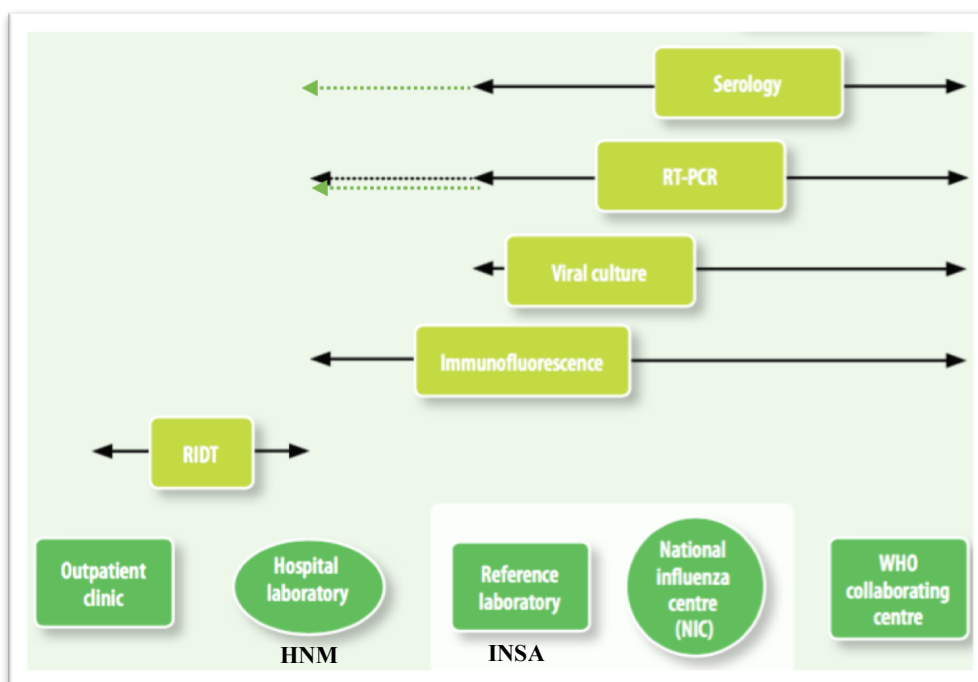
As modalidades de diagnóstico do vírus *Influenza*, têm vindo a ser desenvolvidas desde a sua caracterização inicial em 1933. Estas técnicas podem ser utilizadas na confirmação do diagnóstico clínico (Kamps, Hoffmann, Preiser, & Behrens, 2006). O diagnóstico laboratorial da gripe tornou-se então um ponto de referência na prevenção, contenção, vigilância e tratamento da doença associada. O desenvolvimento de técnicas mais rápidas e precisas para a deteção do vírus *Influenza*, permite que o laboratório forneça um diagnóstico imediato e definitivo, permitindo algumas vantagens aos clínicos, como por exemplo: iniciarem terapias antivirais; limitarem o uso de antibacterianos, usarem medidas apropriadas de controlo de infeção; diminuir a duração de hospitalização; reduzir testes auxiliares de diagnóstico e diminuir os custos de cuidados de saúde. (Petric, Comanor, & Petti, 2006). Uma série de métodos de diagnóstico, incluindo isolamento do vírus, técnica de amplificação do ácido nucleico, testes de diagnóstico rápido baseados em imunocromatografia, entre outros métodos serológicos, estão a ser utilizados não só para deteção do vírus da gripe nos seres humanos, como também na resposta imunológica do indivíduo a estes vírus (Petric et al., 2006; Vemula et al., 2016). No entanto, o sucesso destes métodos de diagnóstico depende de fatores primordiais, como a colheita adequada das amostras biológicas.

Os vírus *Influenza*, como descrito anteriormente, replicam-se principalmente nas células epiteliais do trato respiratório, sendo a principal via de transmissão as gotículas de aerossóis respiratórios transportados pelo ar. Então, a colheita das amostras biológicas para o diagnóstico clínico de deteção do vírus, deve procurar maximizar a recolha de células epiteliais infetadas pelo vírus. São preferencialmente colhidas amostras do trato respiratório nomeadamente: exsudados nasofaríngeo e orofaríngeos; secreções brônquicas; aspirados traqueais e lavados broncoalveolares (estes dois últimos em doentes intubados). O sangue (soro) é a amostra biológica utilizada em testes que visam a pesquisa de imunoglobulinas. (Kamps et al., 2006; Mello, 2010).

Os métodos de diagnóstico disponíveis têm diferenças importantes em termos de desempenho, simplicidade, rapidez, custos de equipamentos e de reagentes. À exceção dos testes de diagnóstico rápido (RIDTs) que podem ser realizados num contexto de *point-of-care* e em configurações remotas, o diagnóstico requer um laboratório capacitado de profissionais qualificados (World Health Organization, 2010a). A Tabela 1 resume as principais diferenças entre os métodos de diagnóstico do vírus *Influenza* no ser humano e a Figura 14 ilustra os diferentes ambientes laboratoriais e os métodos utilizados.

**Tabela 1.** Comparação dos métodos de diagnóstico do vírus *Influenza* no ser humano, segundo a escala: -2 muito desfavorável; -1 desfavorável; 0 característica média; +1 favorável e +2 muito favorável (Kamps et al., 2006).

<b>Métodos de diagnóstico</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Tempo de Resposta</b>	<b>Facilidade de Realização</b>	<b>Acessibilidade</b>
Isolamento viral	+2	-2	-1	+2
RT-qPCR	+2	+1	-1	-2
HI	+1	-2	-1	+2
CF	0	-2	-2	+2
ELISA	+2	-2	+1	+1
DFA	0	+1	+1	+1
RIDTs	-2	+2	+2	0



**Figura 14. Métodos de diagnóstico disponíveis nos diferentes ambientes laboratoriais.** As setas verde, referem-se os métodos disponíveis no laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélío Mendonça. Adaptado de World Health Organization, 2010.

### 6.1. Isolamento do vírus

A cultura ou isolamento de vírus *Influenza*, introduzido na década de 1940, é o método mais tradicional para o diagnóstico do vírus. Esta técnica inicia-se com a inoculação de amostras infetadas em cultura de células permissivas ou em ovos embrionários, propagando-se por 7-10 dias de modo a monitorizar o desenvolvimento do efeito citopático e posterior confirmação por imunofluorescência ou hemadsorção. Na cultura do vírus em ovos de galinha embrionados, as amostras são inoculadas na cavidade amniótica destes ovos (10-12 dias). Esta técnica requer o fornecimento de ovos de galinha fertilizados e incubadoras especiais, consequência que leva a não ser um método utilizado no diagnóstico de rotina.

A cultura do vírus em linhas celulares é executada geralmente usando células primárias ou estabelecidas, por exemplo rim de macaco rhesus (RhMK) ou células de rim caninas Madin-Darby (MDCK), respetivamente (Kamps et al., 2006; Vemula et al., 2016).

## 6.2. Técnica de amplificação do ácido nucleico

O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) por Kary Mullis em 1983 (Vemula et al., 2016), veio revolucionar a área do diagnóstico de doenças infecciosas, por ser um método muito mais sensível, específico e versátil. A evolução desta técnica veio permitir não só a detecção do vírus, como também a identificação do subtipo e a estirpe por métodos de sequenciação. Esta técnica baseia-se na detecção de sequências de ácido nucleico específicas do vírus.

A identificação do vírus da gripe é realizada por uma variante RT-PCR, que compreende as seguintes fases: (i) extração do RNA viral a partir da amostra biológica; (ii) Transcrição reversa do RNA viral para um cDNA de cadeia simples utilizando a enzima transcriptase reversa; e (iii) amplificação e detecção do produto de PCR.

A maioria dos métodos de RT-qPCR para o vírus *Influenza A* e *Influenza B*, utilizam *primers* complementares a genes relativamente estáveis, que codificam a proteína da matriz conservada, podendo detetar com sucesso todas as estirpes virais observadas até ao momento. No vírus *Influenza A*, os *primers* são dirigidos ao segmento 4 (gene HA), permitindo a identificação do subtipo H do vírus (Petric et al., 2006; Vemula et al., 2016). Este foi o método recomendado pela OMS no diagnóstico laboratorial para a pesquisa do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) (as suas especificidades são descritas no item numerado 6.6).

## 6.3. Métodos Serológicos

Os métodos serológicos mais comuns são utilizados para detetar a presença de anticorpos específicos no soro de indivíduos infetados pelo vírus *Influenza*. Os anticorpos específicos aparecem em circulação pela primeira vez aproximadamente duas semanas após a infeção inicial e atingem os níveis máximos às 4-7 semanas após a infeção inicial. Devido a este fato só são indicados num diagnóstico retrospectivo da doença e permitem a quantificação das respostas à vacinação contra a gripe. Estes testes incluem, por exemplo: técnicas de inibição da hemaglutinina (HI); teste de

neutralização do vírus (VN); fixação do complemento (CF) e ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (Petric et al., 2006; Vemula et al., 2016).

#### 6.3.1. Inibição da hemaglutinina (HI)

A HI é o método mais comum usado para determinar a presença de Ac específicos nos humanos, contra a HA do vírus *Influenza*, no soro após uma infecção “natural” ou vacinação. O método é realizado usando diluições em série do soro e baseia-se na capacidade de Ac específicos bloquearem os epítomos, impedindo a ligação do vírus aos eritrócitos (obtidos de animais: frango, cavalo, peru ou mesmo humanos). A maior diluição de soro que iniba a hemaglutinação é designada como o título de HI (Petric et al., 2006; Vemula et al., 2016).

#### 6.3.2. Teste de neutralização do vírus (VN)

A VN, descreve-se na capacidade de os Ac específicos neutralizarem o vírus, prevenindo assim a infecção viral de células. O procedimento executa-se adicionando, 100 unidades infecciosas do vírus, em diluições em série do soro e, após a incubação, a solução é aplicada respetivamente em monocamadas de células suscetíveis, que são então monitorizadas quanto ao efeito citopático. À medida que a diluição do o Ac é maior, o crescimento viral torna-se detetável (Petric et al., 2006). Considera-se como título de VN a maior diluição de soro em que a infecção viral está completamente bloqueada (Vemula et al., 2016).

#### 6.3.3. Fixação do complemento (CF)

A CF mede a resposta de Ac específicos das proteínas internas, NP e M do vírus, após vacinação ou infecção (Vemula et al., 2016), baseando-se na formação do complexo Ag-Ac que posteriormente se liga ou não ao complemento (proteínas séricas que ajudam na eliminação do vírus). Se este complemento se ligar ao complexo, os eritrócitos de ovelha sensibilizados ao complemento não sofrem lise, considerando-se uma reação positiva. Por outro lado, se o complemento não se ligar ao complexo, permanecendo disponível, fixar-se-á aos eritrócitos de ovelha sensibilizados ao complemento, provocando a lise deste. A reação considera-se negativa (Kamps et al., 2006).

#### 6.3.4. Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

Os testes de ELISA, demonstram consistentemente alta sensibilidade e especificidade (Vemula et al., 2016). Fundamentam-se na interação Ac-Ag detetado por uma reação enzimática. O Ag viral encontra-se imobilizado a um suporte sólido e sobre estes coloca-se o soro humano. Se existir Ac no soro, ocorrerá a ligação deste ao Ag. As imunoglobulinas não ligadas são removidas por processos de lavagem. É adicionado um segundo Ac conjugado com a enzima peroxidase, que se liga ao complexo Ac-Ag. As imunoglobulinas não ligadas são novamente removidas por processos de lavagem. Após a adição da solução de substrato, um corante azul é produzido pela enzima ligada. A cor muda para amarelo quando a solução de paragem é adicionada. A presença do Ac viral é indicada pela intensidade da coloração (Virotech Diagnostics, 2016).

#### 6.4. Imunofluorescência direta de anticorpos (DFA)

A DFA, desenvolvida pela primeira vez na década de 1960, envolve a coloração direta de células epiteliais do trato respiratório (esfregaços ou aspirados nasofaríngeos) com Ac específicos do vírus conjugados com um corante fluorescente, observado por microscopia de fluorescência (Vemula et al., 2016).

## 6.5. Testes de diagnóstico rápido de *Influenza* (RIDTs)

Os RIDTs, desenvolvidos para um diagnóstico rápido (aproximadamente 30 minutos) de infecções virais são baseados em ensaios imunoenzimáticos ou técnicas imunocromatográficas. Estes testes utilizam Ac monoclonais que permitem detetar Ag viral presente na amostra do trato respiratório (Petric et al., 2006; Vemula et al., 2016). Normalmente, estes testes apresentam-se disponíveis em forma de tira de nitrocelulose. Quando as amostras são adicionadas à tira do teste, os Ag virais ligam-se aos Ac específicos, conjugados com partículas que permitem a visualização nas tiras de teste. O complexo Ag-Ac conjugado migra ao longo da tira de teste até à área de reação e é capturado por uma linha de anticorpos existente na membrana. Um resultado positivo (presença de Ag virais) para vírus é visualizado com uma linha vermelha na posição de teste “T” e na posição de controle “C”. O alvo de Ag mais comum é a nucleoproteína do vírus. Estes testes não diferenciam os subtipos de *Influenza A* ou de *Influenza B* (World Health Organization, 2010a).

## 6.6. Diagnóstico laboratorial para a deteção do vírus pandémico 2009

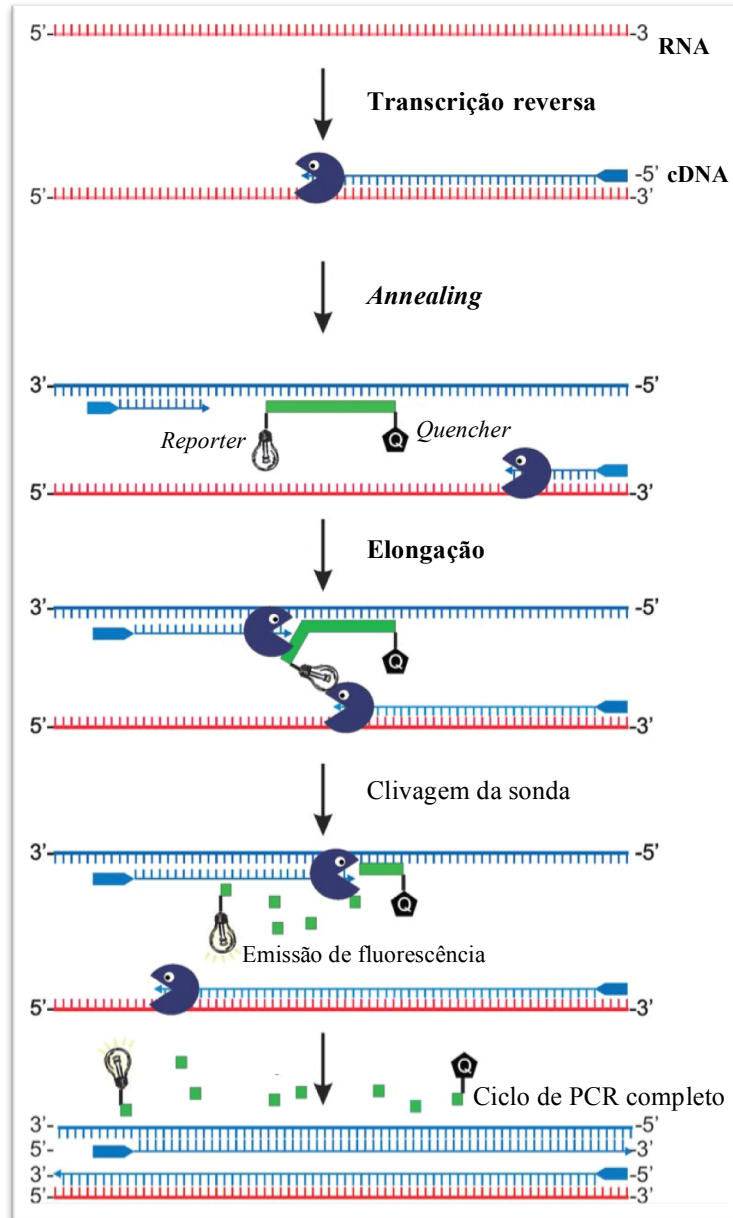
### *Influenza A* (H1N1)

O diagnóstico laboratorial do vírus *Influenza*, foi revolucionado com a implementação do método de reação em cadeia da polimerase em tempo-real (qPCR), tornando-se uma tecnologia de referência na deteção do ácido nucleico. Assim, a 28 de abril de 2009 a OMS e o seu centro colaborador para o vírus *Influenza* no CDC de Atlanta, disponibilizou o protocolo para a deteção do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1). O diagnóstico era realizado por RT-PCR em tempo-real (RT-qPCR) utilizando sondas e *primers* TaqMan®, na deteção qualitativa, *in vitro*, do RNA viral em amostras do trato respiratório (World Health Organization, 2009a).

A RT-PCR, como descrito anteriormente, é um processo que compreende as fases de (i) transcrição reversa da molécula de RNA em cDNA, por meio de enzimas de transcriptase reversa, obtidas a partir de determinados retrovírus, como por

exemplo: a *Avian myeloblastoma virus* (AMV) e a *Moloney murine leukaemia virus* (M-MuLV). Conseqüentemente, (ii) o cDNA recém-sintetizado é amplificado através do uso de *primers* específicos ao gene de interesse (Farrell, 2010; Kamps et al., 2006). A RT-qPCR, possibilita a quantificação em tempo-real do produto amplificado, ou seja, as fases de amplificação, detecção e quantificação são automatizadas, ocorrem em simultâneo e em tempo-real, resultado da utilização de moléculas fluorescentes (sondas TaqMan®) e de um equipamento com um *software* apropriado (*ABI prism 7300 Applied Bioystems*) (Bustin & Mueller, 2005; Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996).

As sondas TaqMan® são sequências curtas de oligonucleotídeos (DNA), que apresentam na extremidade 5' um fluorocromo *reporter* (molécula 6-carboxifluoresceína (FAM), que emite fluorescência a 517 nm) e na extremidade 3' o *quencher* (*blackhole* (BHQ1), molécula que absorve a fluorescência a 480-580 nm) («Black Hole Quencher® Dyes | LGC Biosearch Technologies»; «FAM (6-FAM) Oligo Modifications from Gene Link»; World Health Organization, 2009). Para que exista emissão de fluorescência, é necessário remover o *reporter* da proximidade física do *quencher*, ou seja, que a sonda se ligue ao cDNA na fase de *annealing* e que posteriormente a ligação *reporter-quencher* seja clivada pela atividade nuclease 5' da Taq polimerase no decorrer da elongação (Figura 15) (Bustin & Mueller, 2005). À medida que o processo se repete, mais e mais fluorescência é emitida, sendo captada pelos fotodetetores presentes no aparelho de qPCR, que através do *software* converte estes dados num gráfico  $\Delta R_n$  (quantidade de sonda de hibridação que foi degradada, ou seja, quantidade de fluorescência emitida) por ciclo de qPCR (Figura 17) (de Ladeira, Isaac, & Ferreira, 2011).



**Figura 15. Reação em cadeia da polimerase antecedida pela transcrição reversa em tempo real.** Esquema RT-qPCR com a utilização de sondas TaqMan. Síntese do cDNA a partir do *template* RNA – transcrição reversa. Após a desnaturação (não ilustrado), os *primers* e a sonda TaqMan hibridam nos seus alvos. A sonda contém um fluorocromo *reporter* na extremidade 5', e na extremidade 3' o *quencher*. Durante a elongação, a atividade nucleásica 5' da Taq polimerase desloca-se e cliva a sonda. Separação física do *reporter-quencher*. Emissão de fluorescência do *reporter*. O aumento do sinal de fluorescência é diretamente proporcional ao número de moléculas *reporter* libertadas durante esse ciclo de PCR. Adaptado de Bustin & Mueller, 2005.

## **7. Enquadramento do projeto e objetivos**

### 7.1. Enquadramento do projeto

O atual estudo, realizado no âmbito do Mestrado de Biologia Molecular em Saúde lecionado na Escola Superior de Saúde Egas Moniz, foi desenvolvido na Secção de Biologia Molecular (BM) do Laboratório de Patologia Clínica (LPC) do Hospital Dr. Nélio Mendonça (HNM) situado na cidade do Funchal. A sua missão é a de realização de exames laboratoriais a utentes internados, em consulta e no serviço de urgência, que auxiliem no diagnóstico e acompanhamento clínico do estado de saúde e doença.

### 7.2. Objetivos gerais

Executar o diagnóstico laboratorial das amostras provenientes de indivíduos suspeitos de estarem infetados com o vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1), residentes nos vários concelhos da Região Autónoma da Madeira (RAM), assim como dos indivíduos que se encontravam de férias na RAM.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, verificar a prevalência provocada pelo do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) RAM durante o ano de 2009.

### 7.3. Objetivos específicos

Analisar o número de casos diagnosticados no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, durante o ano de 2009, de acordo com: a presença de sintomatologia; o internamento; o número de casos positivos e negativos para a pesquisa do vírus A(H1N1)pdm09; o género; a gravidez; as faixas etárias; a

distribuição geográfica; a distribuição temporal; morbidade e mortalidade na comunidade residente na RAM.

## 8. Metodologias Experimentais

### 8.1. Delineamento do estudo

Foi desenvolvido um estudo descritivo e retrospectivo, no período de 30 de abril de 2009 a 31 de dezembro de 2009.

### 8.2. Local do estudo

O presente estudo foi desenvolvido na secção de Biologia Molecular, laboratório de biossegurança nível 2 (BSL-2), do Hospital Dr. Nélio Mendonça. Esta secção é responsável pelo diagnóstico por reação em cadeia da polimerase em tempo real de ácidos nucleicos, de bactérias, por exemplo *Chlamydia trachomatis*; *Chlamydia pneumoniae*; *Mycobacterium tuberculosis* e de vírus como é o caso do *Dengue*; *Citomegalovirus*; *Herpes simplex* e de vírus respiratórios, nomeadamente o vírus *Influenza*.

### 8.3. Amostras do Estudo

O estudo incidiu sobre: (i) os dados que constam na folha de “declaração de caso em investigação” fornecida pela Direção-Geral de Saúde (DGS) (formulário Gripe OT-3 em anexo, página 105), preenchidos pelo médico responsável pela primeira avaliação clínica do utente, e (ii) nos resultados obtidos na secção de BM de todas as amostras de utentes com suspeita de infeção pelo vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1), provenientes do Serviço de Urgência, Medicina Intensiva e Internamentos do HNM e Hospital dos Marmeleiros e dos Serviços de Urgência dos Centros de Saúde da ilha da Madeira e ilha do Porto Santo.

## 8.4. Colheitas e processamento de amostras biológicas

### 8.4.1. Colheita de amostras biológicas para o diagnóstico vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1)

As amostras biológicas foram colhidas no Serviço de Urgência, Medicina Intensiva e Internamentos do HNM e Hospital dos Marmeleiros e dos Serviços de Urgência dos Centros de Saúde, pelos médicos ou enfermeiros.

Os tipos de amostras colhidas para análise eram originários do trato respiratório superior (expetorações e exsudados nasofaríngeo e orofaríngeos), ou do trato respiratório inferior (aspirados traqueais, secreções brônquicas, lavados broncoalveolares). A escolha mais apropriada dependia do estado clínico do doente e consequentemente do serviço onde este se encontrava.

A colheita dos exsudados nasofaríngeos e orofaríngeos era realizada utilizando o *Kit da Vircell - Transport Medium Vircell* (Tabela 5 dos anexos, página 96). O meio de transporte, presente no *kit*, tem como função evitar a secagem da amostra, manter a viabilidade dos microrganismos entre a colheita e o processamento e retarda o sobrecrescimento bacteriano em amostras muito contaminadas (Vircell, 2012). Posteriormente as duas zaragatoas eram colocadas dentro do tubo com o meio de transporte. Os produtos do trato respiratório inferior e as expetorações eram colhidas para um frasco estéril de 100ml ou de capacidade inferior.

Os contentores que continham as amostras eram identificados com o nome do utente e a data da colheita e faziam-se acompanhar pelo formulário da Gripe OT-3 preenchido e de imediato eram encaminhados ao LPC, baseando-se nas recomendações gerais descritas da OMS no “*Guidance on Regulation for Transport of Infectious Substances*” (World Health Organization, 2008).

A receção dos produtos para diagnóstico da gripe A fazia-se na triagem do LPC que de seguida os encaminhava à secção de BM. Uma vez nesta, os técnicos de análises clínicas e saúde pública (TACSP) verificavam o formulário e as respetivas amostras,

preenchendo a folha de trabalho (exemplo em anexo, página 106) onde constavam os seguintes dados: nome; idade; sexo; processo clínico; local de observação; produto biológico e terapêutica antiviral.

O processamento analítico era efetuado no máximo até 12 horas e compreendia as seguintes etapas: preparação/ tratamento da amostra (se necessário); extração manual ou automática do RNA viral, amplificação por RT-qPCR e interpretação dos resultados.

#### 8.4.2. Preparação/ tratamento das amostras para a fase de extração do ácido nucleico

Este procedimento destinava-se a todas as amostras do trato respiratório demasiado purulentas (viscosas), por exemplo, expetorações, lavado broncoalveolares, secreções brônquicas e aspirados traqueobrônquicos. A execução era efetuada do seguinte modo:

1. Num tudo de microcentrifuga de 2 mL, pipetou-se 400 µl de amostra e 40 µL de proteinase K da QIAGEN®.
2. Homogeneizou-se e colocou-se no termo-bloco a 56°C durante 60 minutos. Este passo tinha como objetivo fluidificar as amostras, pela ação digestiva da enzima na sua temperatura ótima de ação.
3. Após o tempo de incubação a amostra foi diluída a 1/1 (v/v) com soro fisiológico, ficando pronta para a fase de extração do RNA viral.

#### 8.4.3. Extração dos ácidos nucleicos

O procedimento de extração do RNA viral era executado de duas formas, manual ou automático. Ambos os métodos se fundamentam nas seguintes fases:

- Lise celular – na presença do tampão de lise e em condições desnaturantes a amostra é lisada, ou seja, ocorre a digestão de proteínas do revestimento viral (proteólise) e à inativação das RNases.

- Ligação dos ácidos nucleicos – é adicionada à amostra um álcool (etanol na extração manual ou o isopropanol na extração automática), que permite a adsorção dos ácidos nucleicos a um suporte, neste caso à membrana de sílica (extração manual) ou às partículas magnéticas revestidas de sílica (extração automática).
- Lavagem de contaminantes – os contaminantes, como por exemplo as proteínas e as nucleases são removidos eficazmente pelo uso tampões de lavagem, melhorando a pureza dos ácidos nucleicos, enquanto estes permanecem ligados ao suporte.
- Eluição do ácido nucleico – o tampão de eluição permite a recuperação do ácido nucleico puro.

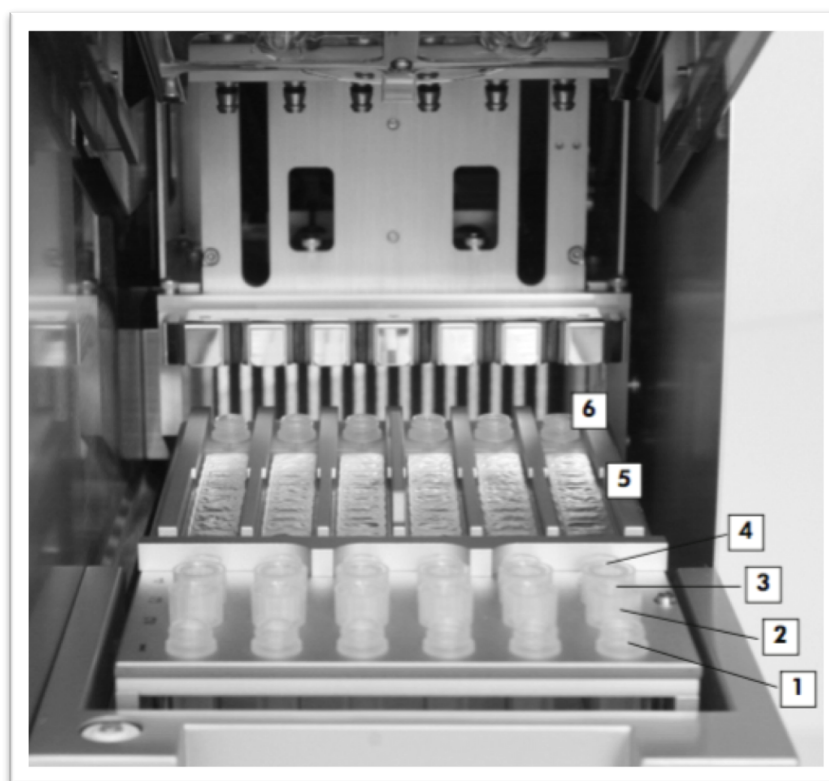
Na extração manual foi utilizado um kit comercial, *QIAamp Viral RNA Mini Kit* da QIAGEN® (Tabela 6 dos anexos, página 97). Este *kit* tem como princípio a adsorção do ácido nucleico a uma membrana à base de sílica com a velocidade de micro-centrifugação (QIAGEN, 2014). O procedimento de extração foi executado do seguinte modo (Figura 26 dos anexos, página 100)

1. Pipetou-se 140 µL da amostra aos 560 µL da alíquota de tampão AVL-RNA *carrier* (previamente preparadas conforme indicado na Tabela 6 dos anexos, página 97). Homogeneizou-se no vórtex durante 15 segundos.
2. Incubou-se 10 minutos à temperatura ambiente (15-25° C). Centrifugou-se levemente de modo a eliminar a dispersão de alguma gota.
3. Adicionou-se 560 µL de etanol a 96% à solução. Centrifugou-se levemente de modo a eliminar a dispersão de alguma gota.
4. No tubo de extração inserido no tubo coletor, adicionou-se 630 µL da solução anterior. Centrifugou-se durante 1 minuto a 8000 rpm. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se o tubo de extração num novo tubo coletor.
5. Adicionou-se novamente 630 µL da solução preparada no passo 3. Centrifugou-se durante 1 minuto a 8000 rpm. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se o tubo de extração num novo tubo coletor.
6. Adicionou-se 500 µL do tampão AW1. Centrifugou-se 1 minuto a 8000 rpm. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se o tubo de extração num novo tubo coletor.

7. Adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  do tampão AW2. Centrifugou-se 1 minuto a 8000 rpm. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se o tubo de extração num novo tubo coletor.
8. Centrifugou-se na velocidade máxima (13400 rpm) durante 1 minuto. Descartou-se o tubo coletor e colocou-se o tubo de extração num novo tubo coletor de microcentrífuga de 1,5 mL.
9. Adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  do tampão AVE e à temperatura ambiente incubou-se durante 1 minuto. Centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 minuto.
10. Recolheu-se o eluado com o RNA extraído e descartou-se a coluna de extração.

A extração automática era realizada no aparelho *EZI Advanced*, que fornece um procedimento totalmente automatizado para a purificação de ácidos nucleicos. O princípio fundamenta-se na tecnologia de partículas magnéticas combinada com a velocidade e eficiência da purificação de ácidos nucleicos (QIAGEN, 2010). Utilizou-se então o kit *EZI Virus Mini Kit v2.0* da QIAGEN® (Tabela 7 dos anexos, página 98). O procedimento de extração foi executado no aparelho *EZI Advanced* e procedeu-se do seguinte modo (Figura 26 dos anexos página 100):

1. Transferiu-se 400  $\mu\text{L}$  da amostra para o tubo coletor de 2 mL;
2. Inverteu-se os cartuchos de reagentes 3 vezes, para homogeneizar as partículas magnéticas depositadas no fundo do cartucho e introduziu-se na posição 5 - Figura 16. Colocou-se um tubo de 1,5 mL na posição 6 - Figura 16.;
3. Selecionou-se o programa: volume amostra = 400  $\mu\text{L}$  e volume eluado = 60  $\mu\text{L}$
4. Introduziu-se no suporte de trabalho do equipamento os seguintes componentes: tubos de eluado de 1,5 mL (posição 1) os suportes descartáveis de pontas contendo as pontas descartáveis com filtro (posição 2); tubos de 1,5 mL com 60  $\mu\text{L}$  da solução Proteinase - RNA *carrier* preparados anteriormente (posição 3) e os tubos de 2 mL com 400  $\mu\text{L}$  de amostra (posição 4) como mostra a Figura 16.



**Figura 16. Suporte de trabalho do EZ1 Advanced.** 1. Tubos de Eluado (1,5 ml); 2. Suportes e pontas com filtro descartáveis; 3. Tubo de 1,5 ml com RNA *carrier* – Tampão AVE; 4. Tubos de 2 ml com amostra; 5. Cartucho de reagente; 6. Tubos de 1,5 ml no bloco de aquecimento (QIAGEN, 2010).

#### 8.4.4. Detecção dos ácidos nucleicos

Para a realização deste método, com base no protocolo do CDC, foram utilizados dois *kits* comerciais, o *AgPath-ID<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR* da *Applied Biosystems*, (Tabela 8 dos anexos, página 99) e *TaqMan<sup>TM</sup> Influenza A (H1N1) Assay Set* (Tabela 9 dos anexos, página 101). O processo de detecção foi efetuado no termociclador *ABI prim 7300* da *Applied Biosystems*. O procedimento foi realizado do seguinte modo:

1. Os reagentes: água livre de nucleases, Mix de enzima, Tampão RT-PCR e as sondas e *primers* (Tabela 8 dos anexos, página 100) foram colocados num bloco refrigerado.
2. Identificou-se quatro tubos de microcentrifuga de 1,5 mL com: *InfA* (1); *swInfA* (2); *swHI* (3) e *RNase P* (4), para a preparação das respectivas *MasterMix* (MM).

3. Segundo a Tabela 10 dos anexo (página 102), pipetou-se para cada tubo de *MasterMix* (1, 2, 3 e 4), os volumes correspondentes ao número de reação a processar.
4. Centrifugou-se durante 5 segundos a 8000 rpm de modo a colocar todo o conteúdo no fundo do tubo. Colocou-se cada *MasterMix* no bloco refrigerado.
5. Colocou-se a placa de 96 poços numa microplaca refrigerada. Pipetou-se 20  $\mu$ L da cada *MasterMix* (1, 2, 3 e 4) por colunas (identificadas por números na placa) e pipetou-se 5  $\mu$ L do NTC, PC e amostras por fila (identificadas por letras na placa) (Tabela 11 dos anexos, página 102). Para o NTC foi utilizado água livre de nucleases e para o PC foram utilizadas amostras positivas para o vírus A(H1N1)pdm09.
6. Após a pipetagem, a placa era selada com uma película adesiva transparente, para evitar a evaporação da solução nos poços e possíveis contaminações.
7. Inseriu-se a microplaca no aparelho *ABI prim 7300 Fast* e selecionou-se o programa *Data\_H1N1\_AgPath*, previamente criado com os seguintes parâmetros: transcrição reversa a 50°C durante 30 min; inibidor de ativação da Taq a 95°C durante 2 min; amplificação PCR a 95°C durante 15 seg. e a 55°C durante 30 seg., por 45 ciclos.
8. Ao fim de aproximadamente 2 horas e 45 minutos os resultados eram obtidos na forma de curvas (exemplo Figura 17). A leitura dos mesmos era efetuada pelos técnicos de diagnóstico e terapêutica que registavam nas folhas de trabalho. Estas eram posteriormente entregues à médica responsável pela seção de BM, que comunicava o resultado ao médico da prescrição.

### 8.5. Análise estatística dos resultados

Os dados provenientes dos formulários da Gripe OT-3 (preenchidos pelos médicos) e das folhas de trabalho, já com o registo dos resultados (preenchidos pelos

TACSP) foram compilados no *software* Microsoft® Excel para Mac 2015 e utilizou-se este *software* na construção de gráficos e tabelas de frequência (nº de casos) e percentagem (%). O tratamento dos dados deste estudo fundamentou-se na análise descritiva e retrospectiva, utilizando o *software Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 24, na distribuição dos casos.

Foram estudadas todas as amostras, mesmo as que não apresentavam registos disponíveis consoante a variável em estudo. Esses casos foram registados como “desconhecido”. Numa primeira parte verificou-se a prevalência das amostras analisadas, consoante: a sintomatologia (com sintomas, sem sintomas e desconhecido); o internamento (internamento, em observação, não sujeito a internamento e desconhecido); a distribuição geográfica (RAM; Portugal Continental; Europa, África e América; e desconhecido); a distribuição temporal (de abril a dezembro de 2009); resultado do diagnóstico por RT-qPCR para vírus A(H1N1)pdm09 (negativo; positivo e desconhecido); género (feminino, masculino ou desconhecido); gravidez; faixas etárias (0-9, 10-19, 20-29, 30-39, 40-49, 50-59 e ≥60 anos); a morbilidade (morbilidade total e desconhecido); o tipo de morbilidade (doenças pulmonares, renais, cardiovasculares, hepáticas, hematológicas, oncológicas, imunodeprimidos, obesidade, má nutrição, HIV, doenças metabólicas e neurológicas); a morbilidade dos doentes internados e por fim a mortalidade.

Na segunda fase do estudo, descreveu-se os casos com infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09, tendo em conta: a sintomatologia, o internamento, a distribuição geográfica e temporal, género e gravidez, as faixas etárias, a morbilidade, a morbilidade dos doentes internados e a mortalidade.

Por último, observou-se a frequência da mortalidade provocada pela infeção viral, segundo: a distribuição geográfica, sintomas, internamentos, distribuição temporal, o género, gravidez, faixas etárias e morbilidade.

Em suma pretende-se com este estudo, conhecer o quadro epidemiológico provocado pelo vírus da gripe A na RAM durante o ano 2009.

## **9. Resultados e interpretação**

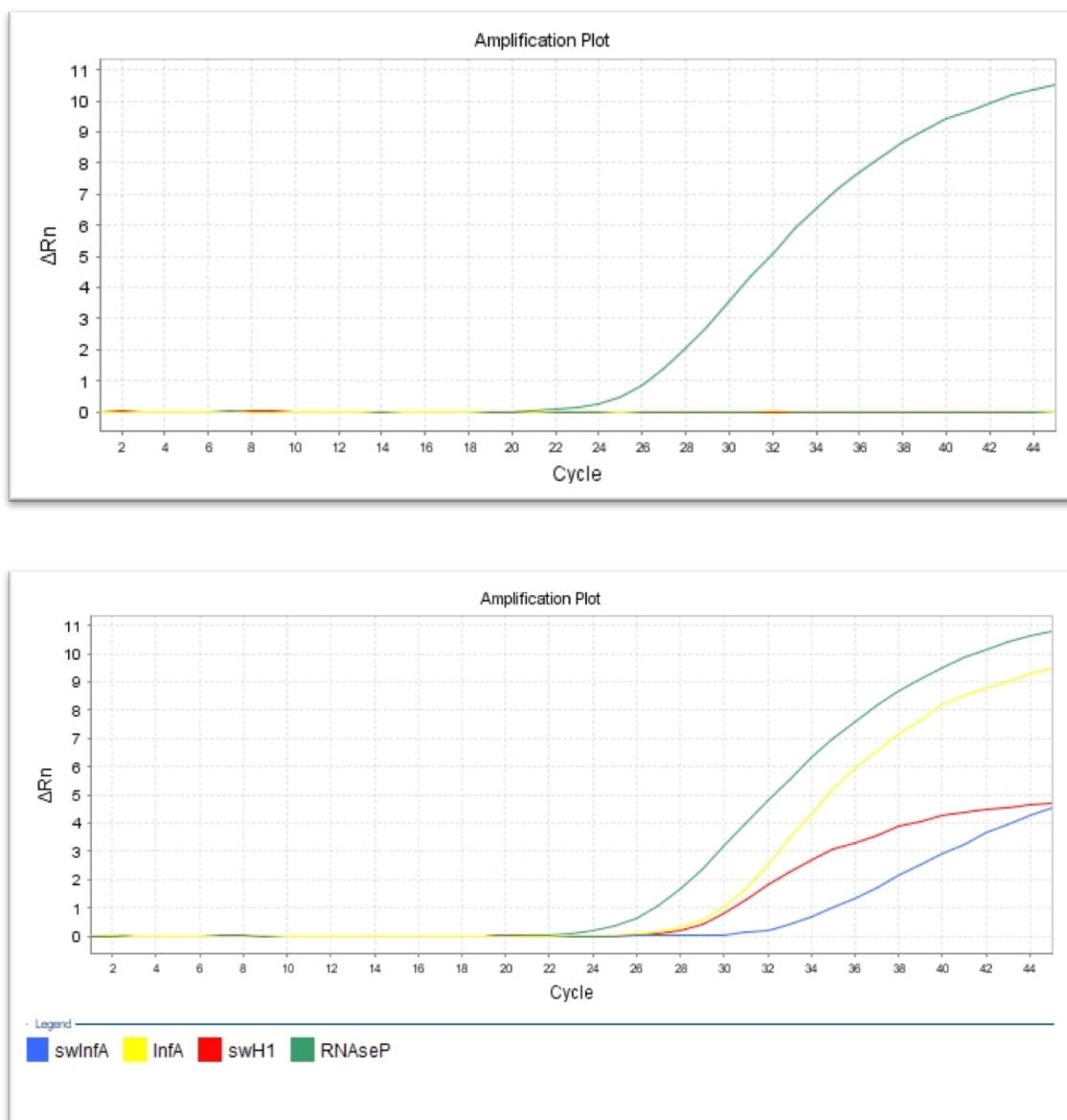
O diagnóstico realizado na seção de Biologia Molecular, enquadrada no LPC do HNM, compreende o período de abril a dezembro de 2009. Num total foram analisadas 1687 amostras do trato respiratório, de doentes com síndrome gripal, que se deslocaram às unidades de saúde da Madeira e Porto Santo.

Os resultados foram obtidos por RT-qPCR com base na emissão de fluorescência do fluorocromo FAM presente na sonda TaqMan®, adquiridas ao longo de 45 ciclos de reação. A leitura e interpretação das curvas de amplificação (exemplo Figura 17) foram realizadas do seguinte modo:

- Todas as amostras deveriam apresentar curva positiva na sonda RNase P, pois visa o gene da RNase P humana e, portanto, serviam como um controle interno positivo para o ácido nucleico humano, ou seja, indicava que o processo de colheita da amostra e extração do RNA foram bem-sucedidos;
- Uma amostra era considerada positiva para o vírus A(H1N1)pdm09, se as quatro sondas: swInfA; InfA; swH1 e RNase P, ostentassem uma curva positiva.
- Os resultados eram considerados negativos, quando eram apenas obtidas as curvas da sonda RNase P.

No entanto era possível fazerem-se outras duas interpretações dos resultados, mas que não foram consideradas neste estudo:

- Se as curvas das sondas InfA e RNase P fossem positivas, indicava presença do vírus *Influenza A* sazonal;
- Se as curvas fossem positivas para as sondas InfA, swInfA e RNase P, revelava presença de um vírus *Influenza A* do tipo suíno, todavia não pertencente ao subtipo H1N1.



**Figura 17. Resultados obtidos na detecção do vírus pandêmico 2009 *Influenza A (H1N1)*.** Gráfico superior – resultado negativo para o vírus A(H1N1)pdm09. Gráfico inferior – resultado positivo para o vírus A(H1N1)pdm09. Os gráficos mostram: no eixo do y o  $\Delta Rn$  e no eixo do x o número de ciclos da reação de PCR. O gráfico de cima representa um resultado negativo para o vírus pandêmico, apenas existe emissão de fluorescência na sonda RNaseP. O gráfico de baixo representa um resultado positivo para o vírus pandêmico, detetou-se emissão de fluorescência para as 4 sondas (swInfA, InfA, swH1 e RNaseP). A azul, swInfA – sonda do vírus *Influenza A* suíno. A amarelo, InfA – sonda do vírus *Influenza A*. A vermelho, swH1 – sonda do vírus *Influenza H1* suíno. A verde, RNaseP – sonda do gene RNase P humano.

## 9.1. Estudo da prevalência das amostras analisadas

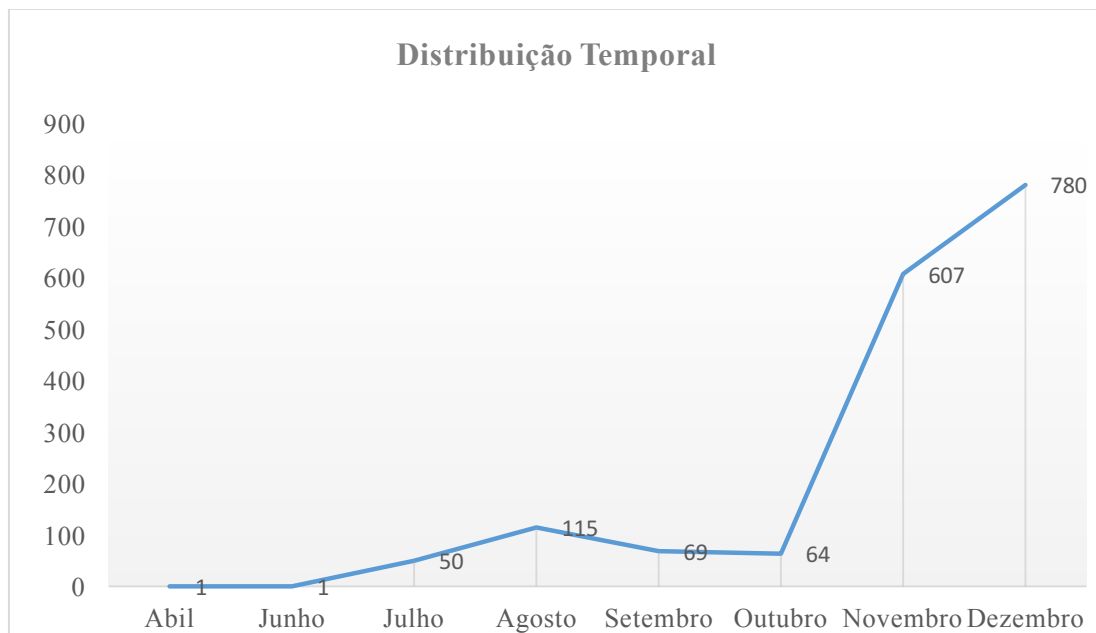
No período que compreende este estudo, foram analisadas 1687 amostras biológicas de indivíduos com suspeita de infecção pelo vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1). Dos registos verificou-se, que 985 (58,4%) dos indivíduos que recorriam a um serviço de urgência da RAM, referia sintomatologia; 2 (0,1%) não apresentavam sintomas e 700 (41,5%) dos indivíduos não possuíam registo de sintomas. Apurou-se que 189 (11,2%) casos correspondiam a indivíduos internados; 36 (2,1%) dos indivíduos ficaram sob observação; 54 (3,2%) não foram sujeitos a internamento e 1408 (83,5%) dos registos não continham informação relativamente a este parâmetro (Tabela 2).

A distribuição geográfica, relativamente ao país de residência da população analisada compreende: 1233 (73,1%) indivíduos residentes na RAM; 55 (3,3%) casos referem-se a residentes num destes países Europa, África e América; 8 (0,5%) indivíduos estudados residem em Portugal Continental e 391 (23,1%) não mencionavam registos do país de residência (Tabela 2). As amostras deste estudo foram analisadas ao longo de 9 meses (de abril a dezembro de 2009), tendo sido atingido os picos nos meses de novembro e dezembro, com 607 (36%) e 780 (46,2%) respetivamente (Figura 18).

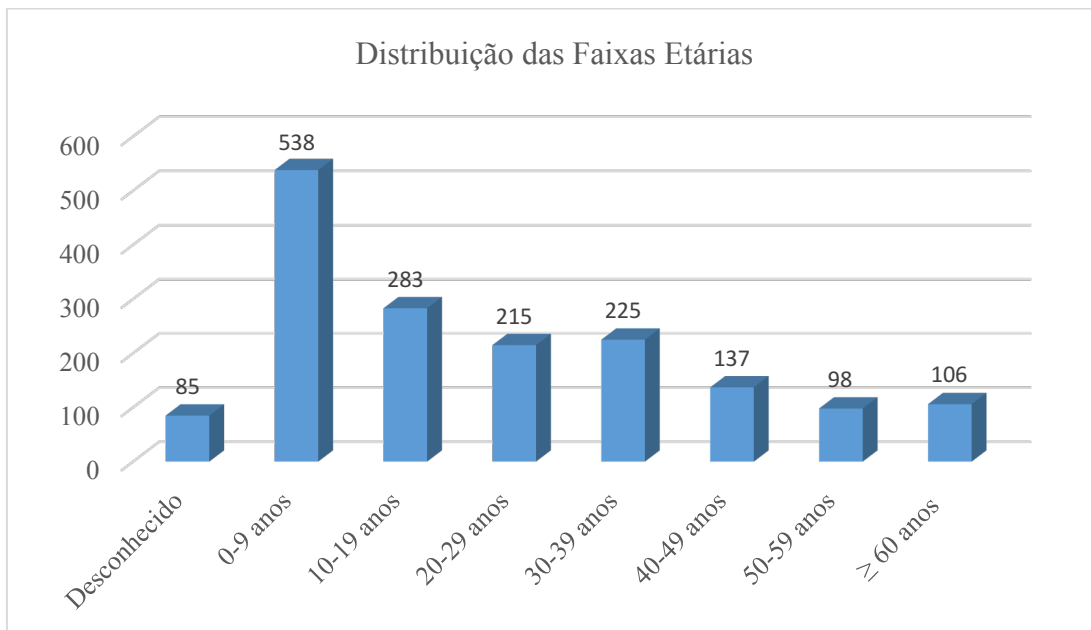
Os resultados obtidos no diagnóstico do vírus A(H1N1)pdm09 foram os seguintes: 920 (54,5%) amostras com resultado negativo, 691 (41,0%) amostras com resultado positivo e 76 (4,5%) amostras com resultado “desconhecido”, (ou seja, este resultado não se fazia constar nos registos do laboratório) (Tabela 2). Relativamente à distribuição por género dos indivíduos analisados: 871 (51,6%) eram indivíduos do sexo feminino, 809 (48,0%) eram indivíduos do sexo masculino e 7 (0,4%) amostras não comportavam registo sobre a género. Verificou-se também que dos indivíduos do sexo feminino, 71 (8,2%) mulheres estavam grávidas (Tabela 2).

A população em estudo foi estratificada por faixas etárias dos: 0-9 anos, 538 (31,9%) casos; 10-19 anos, 283 (16,8%) amostras; 20-29 anos, 215 (12,7%) indivíduos; 30-39 anos, 225 (13,3%) casos; 40-49 anos, 137 (8,1%) indivíduos; 50-59 anos, 98 (5,8%) casos e  $\geq 60$  anos, 106 (6,3%) amostras. Em 85 (5,0%) dos casos não foi possível obter informação da idade (Figura 19).

Para o parâmetro “morbilidade” foram registados 198 (11,7%) indivíduos, que apresentavam as seguintes patologias: doenças pulmonares 134 (7,9%); doenças cardiovasculares 12 (0,7%); doenças renais 9 (0,5%); doença oncológica, doença metabólica e imunodepressão 7 (0,4%) indivíduos respetivamente; doença hepática, HIV e doença neurológica com 5 (0,3%) indivíduos cada uma; a obesidade atinge 3 (0,2%) dos indivíduos e por fim as doenças hematológicas e uma má nutrição foi registada em 2 (0,1%) indivíduos. Os restantes 1489 (88,3%) casos não apresentavam registos ou não tinham morbilidade. Pela morbilidade ser um fator considerado de risco, verificou-se que 115 (6,8%) dos indivíduos estavam ou foram internados, dos quais: 98 (85,2%) indivíduos tinham doenças pulmonares; 8 (7,0%) indivíduos com doenças cardíacas; 3 (2,6%) doentes com patologias renais; 2 (1,7%) doentes oncológicos e outros 2 (1,7%) com doença hepática; 1 (0,9%) indivíduo com HIV e 1 (0,9%) doente com patologia metabólica (Tabela 2). Registou-se 12 (0,7%) óbitos nos 9 meses decorrentes do estudo (Tabela 2)



**Figura 18.** Gráfico da distribuição, em frequência, do número total de casos estudado em 2009 por mês.



**Figura 19.** Gráfico da distribuição, em frequência, do número total de casos estudado em 2009 por faixa etária.

**Tabela 2.** Distribuição, em frequência e percentagem, dos casos estudados consoante: Sintomatologia; Internamento; Distribuição Geográfica; Resultado do diagnóstico de A(H1N1)pdm09; Género; Gravidez; Morbilidade; Internamento com Morbilidades e Mortalidade.

<b>Distribuição dos Casos Estudados.</b>			
Total: 1687			
<b>Característica</b>		<b>Nº de Casos</b>	<b>%</b>
<b>Sintomatologia</b>	Desconhecido	700	41,5
	Com Sintomas	985	58,4
	Sem Sintomas	2	0,1
<b>Internamento</b>	Desconhecido	1408	83,5
	Internamento	189	11,2
	Em Observação	36	2,1
	Não Sujeito a Internamento	54	3,2
<b>Distribuição Geográfica</b>	Desconhecido	391	23,1
	RAM	1233	73,1
	Europa, África e América	55	3,3
	Portugal Continental	8	0,5
<b>A(H1N1)pdm09</b>	Desconhecido	76	5,4
	Negativo	920	54,5
	Positivo	691	41,0
<b>Género</b>	Desconhecido	7	0,4
	Masculino	809	48,0
	Feminino	871	51,6
	Grávidas	71	8,2
<b>Morbilidade</b>	Desconhecido	1489	88,3
	Morbilidade total	198	11,7
	D. Pulmonar	134	7,9
	D. Cardiovasculares	12	0,7
	D. Renais	9	0,5
	D. Oncológicas	7	0,4
	D. Metabólicas	7	0,4
	Imunodeprimidos	7	0,4
	D. Hepáticas	5	0,3
	HIV	5	0,3
	D. Neurológicas	5	0,3
	Obesidade	3	0,2
	D. Hematológica	2	0,1
	Má Nutrição	2	0,1
<b>Internamento com Morbilidade</b>	Desconhecido	74	4,4
	Morbilidade de Internados	115	6,8
	D. Pulmonar	98	85,2
	D. Cardiovasculares	8	7,0
	D. Renais	3	2,6
	D. Oncológicas	2	1,7
	D. Hepáticas	2	1,7
	HIV	1	0,9
D. Metabólicas	1	0,9	
<b>Mortalidade</b>	Não	1675	99,3
	Sim	12	0,7

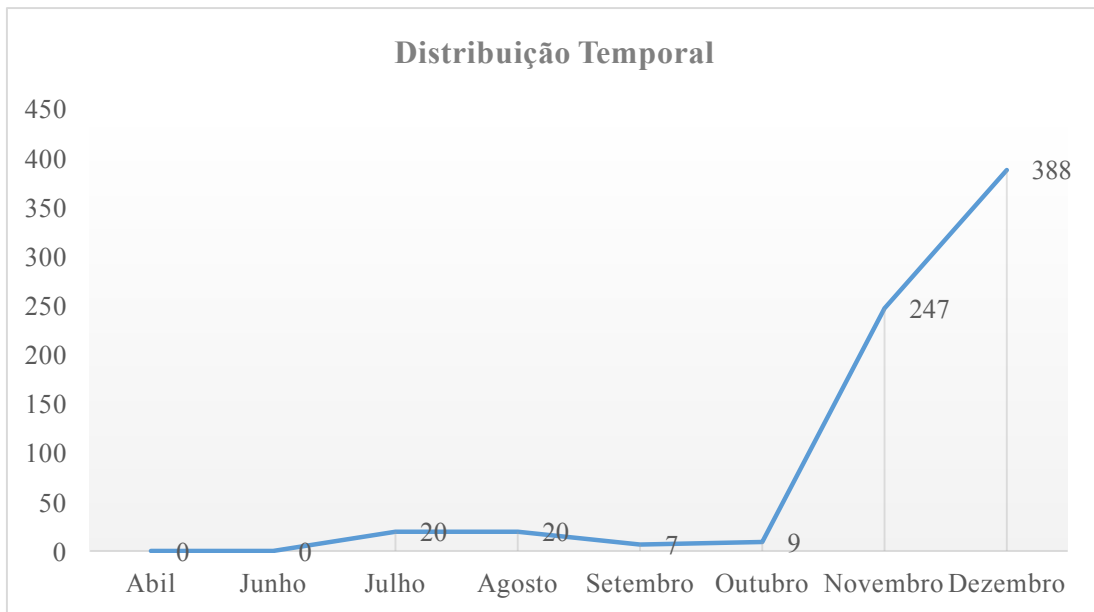
## 9.2. Distribuição dos casos por infecção do vírus pandémico 2009

### Influenza A (H1N1)

A infecção causada pelo vírus A(H1N1)pdm09, foi diagnosticada em 691 indivíduos, como referido anteriormente. A partir destes, constatou-se os seguintes dados: 383 (55,4%) dos indivíduos apresentavam sintomatologia; 308 (44,6%) indivíduos não apresentavam registos referentes à presença ou ausência de sintomas gripais. Tendo em conta a variável “internamento”, foram detetados com infecção os seguintes casos: 73 (10,6%) doentes internados; 4 (0,6%) doentes infetados que ficaram sobre observação e 8 (1,2%) doentes em ambulatório. Para a maior parte dos indivíduos infetados, 606 (87,7%), não foi possível aferir este parâmetro (Tabela 3).

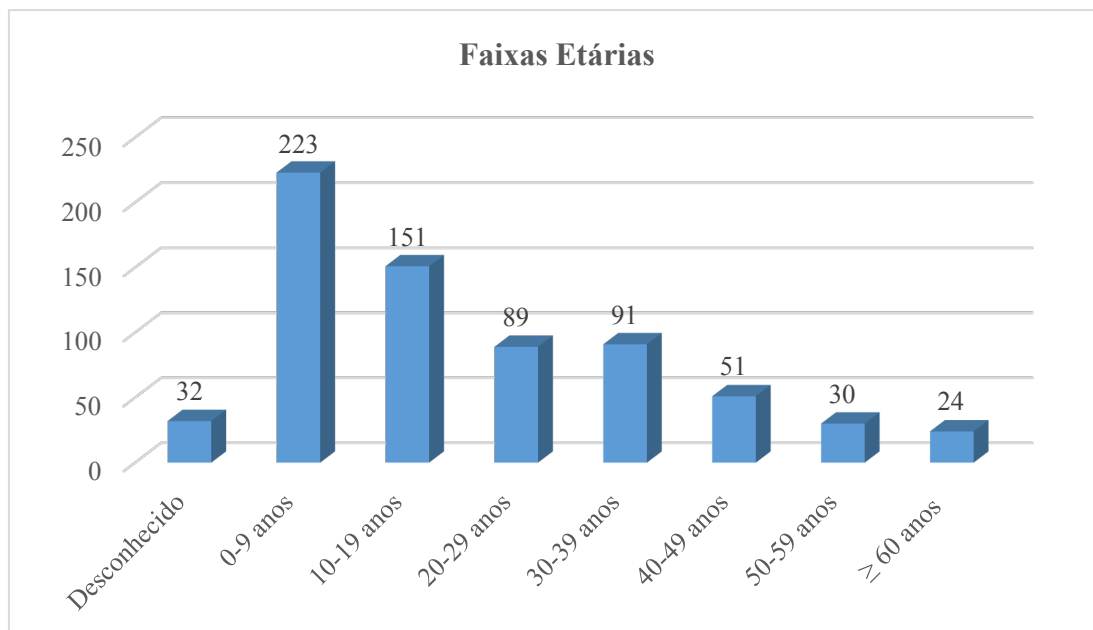
A distribuição geográfica dos indivíduos infetados, segundo a residência, ocorreu do seguinte modo: 544 (78,7%) casos na RAM; 12 (1,7%) casos na Europa, África e América; 2 (0,3%) dos casos em Portugal Continental e 133 (19,2%) casos de residência “desconhecida”. Em relação à distribuição temporal, observou-se que os meses com maior número de casos de indivíduos afetados pelo vírus A(H1N1)pdm09 foram novembro e dezembro com 247 (35,7%) e 388 (56,2%) respetivamente (Figura 20).

No sexo feminino, verificou-se que 347 (50,2%) das mulheres analisadas estavam infetadas pelo vírus da gripe, das quais 37 (10,7%) estavam grávidas. No sexo masculino registaram-se 344 (49,8%) resultados positivos (Tabela 3).



**Figura 20.** Gráfico da distribuição, em frequência, do número de casos de infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoantes os meses do estudo.

O Figura 21 ilustra a distribuição dos casos positivos consoante a faixa etária. Podemos apurar que: 223 (32,3%) casos são referentes à faixa etária dos 0-9 anos; 151 (21,8%) amostras de indivíduos entre 0-19 anos; 89 (12,9%) casos detetados na faixa etária dos 20-29 anos; 91 (13,2%) diagnósticos de indivíduos com idade compreendidas entre os 30-39 anos; 51 (7,4%) casos na faixa etária dos 40-49 anos; 30 (4,3%) casos são de indivíduos com idades entre os 50-59 anos e 24 (3,5%) casos de indivíduos infetados pelo vírus tinham idades  $\geq 60$  anos.



**Figura 21.** Gráfico representativo da distribuição, em frequência, do número de casos de infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoantes as faixas etárias.

A infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 foi observada em 86 (12,4%) indivíduos com morbilidades, destes: 62 (72,1%) apresentavam doenças pulmonares; 4 (4,6%) foram doentes cardiovasculares; 3 (3,5%) com doença oncológica, 3 (3,5%) imunodeprimidos e 3 (3,5%) doentes com patologias metabólicas; 2 (2,3%) indivíduos com doença hepática; 2 (2,3%) com doenças hematológicas (todos os doentes infetados); 2 (2,3%) com obesidade e 2 (2,3%) portadores de HIV; 1 (1,2%) doente renal; 1 (1,2%) com má nutrição e ainda 1 (1,2%) com doença neurológica. Observou-se que 43 indivíduos com morbilidade encontravam-se em internamento. As doenças pulmonares com 39 (90,7%) casos; doenças cardíacas 2 (4,7%) casos e as doenças hepáticas e metabólicas, ambas com 1 (2,3%) caso (Tabela 3). Verificou-se que 605 (87,6%) dos doentes infetados não possuíam registo de morbilidade ou não tinham patologias de risco. A mortalidade ocorreu em 10 (1,4%) indivíduos (Tabela 3).

**Tabela 3.** Distribuição, em frequência e percentagem, dos casos positivos para a infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoante: Sintomatologia; Internamento; Distribuição geográfica; Género; Gravidez; Morbilidade; Internamento com Morbilidade e Mortalidade.

<b>Distribuição dos casos infetados pelo vírus A(H1N1)pdm09</b>			
Total: 691 amostras			
<b>Característica</b>		<b>Nº de Casos</b>	<b>%</b>
<b>Sintomatologia</b>	Desconhecido	308	44,6
	Com Sintomas	383	55,4
	Sem Sintomas	0	0,0
<b>Internamento</b>	Desconhecido	606	87,7
	Internamento	73	10,6
	Em Observação	4	0,6
	Não Sujeito a Internamento	8	1,2
<b>Distribuição Geográfica</b>	Desconhecido	133	19,2
	RAM	544	78,7
	Europa, África e América	12	1,7
	Portugal Continental	2	0,3
<b>Género</b>	Desconhecido	0	0,0
	Masculino	344	49,8
	Feminino	347	50,2
	Grávida	37	10,7
<b>Morbilidade</b>	Desconhecido	605	87,6
	Morbilidade total	86	12,4
	D. Pulmonar	62	72,1
	D. Cardiovasculares	4	4,6
	D. Oncológicas	3	3,5
	D. Metabólicas	3	3,5
	Imunodeprimidos	3	3,5
	D. Hepáticas	2	2,3
	D. Hematológica	2	2,3
	Obesidade	2	2,3
	HIV	2	2,3
	D. Renais	1	1,2
	D. Neurológicas	1	1,2
	Má Nutrição	1	1,2
<b>Internamento com Morbilidade</b>	Desconhecido	30	
	Morbilidade de Internados	43	
	D. Pulmonares	39	90,7
	D. Cardíacas	2	4,7
	D. Hepáticas	1	2,3
<b>Mortalidade</b>	D. Metabólicas	1	2,3
		10	1,4

### 9.3. Distribuição dos casos de mortalidade por infecção pelo vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1)

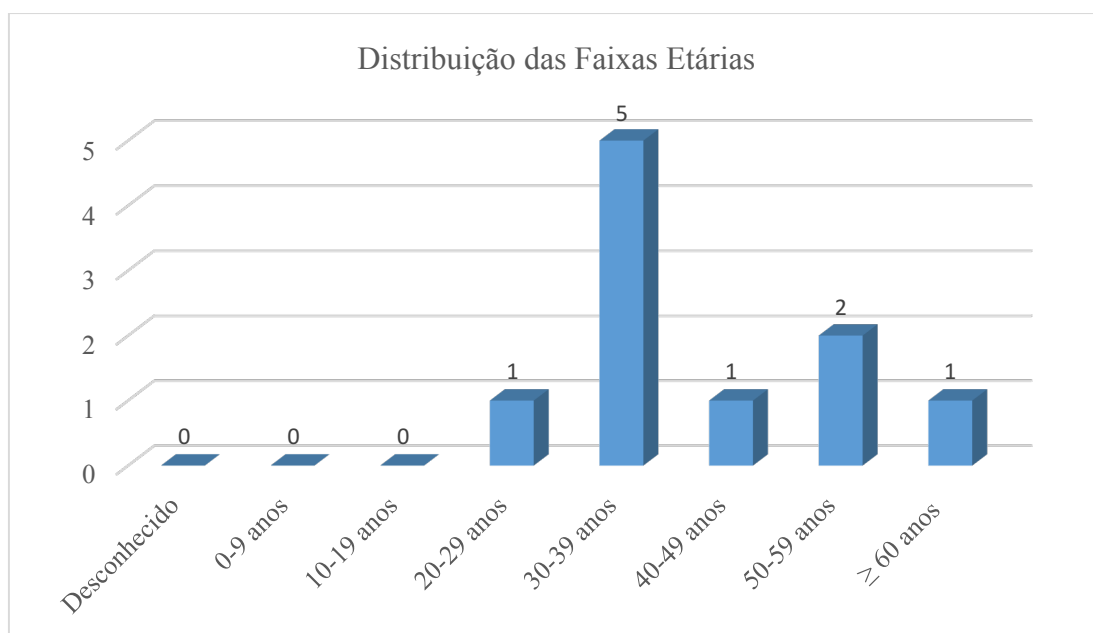
Os 10 casos de mortalidade causados pela infecção do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1), ocorreram na população residente na RAM, todos os indivíduos apresentaram sintomas e encontravam-se em internamento (Tabela 4). Em novembro ocorreram 2 (20,0%) mortes, e em dezembro, 8 (80,0%) mortes (Tabela 4). A frequência de mortalidade encontrada consoante o género foi igual nos dois sexos, ou seja, 5 (50,0%) mortes ocorreram no sexo feminino (das quais 1 (20,0%) estava grávida) e 5 (50,0%) óbitos no sexo masculino. (Tabela 4).

Constatou-se que 7 (70,0%) dos indivíduos que morreram por infecção do vírus, tinham morbidade associada, assim: 4 (57,1%) apresentavam patologias pulmonares; 2 (28,6%) doenças cardiovasculares e 1 (14,3%) doença metabólica. Os restantes 3 (30,0%) casos apresentavam morbidade “desconhecida” (Tabela 4).

As faixas etárias onde se ocorreram os óbitos por infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09, são descritas por ordem crescente: 1 (10,0%) morte em cada umas das seguintes faixas etárias: 20-29, 40-49 e  $\geq 60$  anos; 2 (20,0%) mortes em indivíduos com 50-59 anos e 5 (50,0%) mortes nos indivíduos entre os 30-39 anos (Figura 22).

**Tabela 4.** Distribuição, em frequência e percentagem, da mortalidade resultado da infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoante: Género, Gravidez; Mês e Morbilidade.

<b>Distribuição da mortalidade causada por infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09.</b>			
Total de 10 mortes			
<b>Característica</b>		<b>Nº de Casos</b>	<b>%</b>
<b>Distribuição</b>			
<b>Geográfica</b>	RAM	10	100
<b>Sintomas</b>		10	100
<b>Internamento</b>		10	100
<b>Género</b>	Masculino	5	50
	Feminino	5	50
	Grávidas	1	20
<b>Mês</b>	Novembro	2	20
	Dezembro	8	80
<b>Morbilidade</b>	Desconhecido	3	30
	Morbilidade total	7	70
		D. Pulmonar	4
	D. Cardiovasculares	2	28,6
	D. Metabólicas	1	14,3



**Figura 22.** Gráfico representativo da distribuição, em frequência, da mortalidade provocada pela infecção do vírus A(H1N1)pdm09 consoante as faixas etárias.

## 10. Discussão

O método de diagnóstico RT-qPCR, eleito para a pesquisa do vírus A(H1N1)pdm09, revelou ser sensível e eficaz, permitindo fornecer os resultados aos clínicos em tempo útil para tomada de decisões clínicas. Por outro lado, este estudo apresentou como principal dificuldade, o uso exclusivo dos registos manuscritos (formulário Gripe OT-3 e folhas de trabalho), onde muitas das informações encontravam-se incompletas. Embora, nos resultados estejam incluídos os casos “desconhecidos”, estes não serão discutidos.

Para um estudo epidemiológico mais completo, haveria necessidade de complementação com outras fontes, por exemplo, com os dados epidemiológicos do laboratório de referência, para a pesquisa do vírus da gripe, do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Este instituto analisou em simultâneo as amostras estudadas no LPC do HNM. Os dados estatísticos analisados pelo INSA foram fornecidos, no entanto a sua interpretação não os acompanhava, por este motivo, não foi possível completar as informações “desconhecidas” deste trabalho. Mesmo assim, o uso exclusivo dos registos do LPC, permanecem como importante fonte de informação permitindo rever em “números”, o que ocorreu na RAM, com a circulação do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1).

A utilização dos dados para realização deste projeto, no período compreendido entre abril a dezembro de 2009, teve a autorização da Diretora do Laboratório de Patológica Clínica do Hospital Dr. Nélio Mendonça, Dra. Graça Andrade.

### 10.1. Sintomatologia, Morbilidades e Internamentos

Os sintomas mais comuns mencionados na infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09, incluíram tosse, febre, dor de garganta, dores musculares, mal-estar e dor de cabeça. Alguns pacientes apresentaram sintomas gastrointestinais (náuseas, vômitos e / ou

diarreia) (World Health Organization, 2009b). Estudos realizados nos EUA, Reino Unido e Japão relataram também a presença de sintomas clínicos associados à infecção por vírus pandêmico 2009 *Influenza A* (H1N1) (Mpolya et al., 2009). Através deste estudo, conseguiu-se apurar que mais de metade, 985 (58,4%) (Tabela 2), dos indivíduos que recorreram a uma unidade de saúde da RAM, com suspeita de infecção pelo vírus, apresentavam pelo menos um dos sintomas descritos anteriormente. No entanto, somente em 383 (55,4%) indivíduos confirmou-se a presença do vírus (Tabela 3).

As informações clínicas obtidas, mostraram ainda que 189 (11,2%) indivíduos foram ou encontravam-se internados (Tabela 2), dos quais 73 (10,6%) estavam infetados (Tabela 3); 54 (3,2%) indivíduos aguardavam o resultado em ambulatório (Tabela 2), dos quais 8 (1,2%) estavam infetados (Tabela 3). Apenas 36 (2,1%) dos indivíduos ficaram sob observação (Tabela 2) até decisão clínica consoante o resultado do diagnóstico, que se mostrou positivo em 4 (0,6%) indivíduos (Tabela 3).

A novembro de 2009 a OMS refere que os fatores de riscos associados ao vírus A(H1N1)pdm09, foram considerados semelhantes aos fatores de risco identificados em complicações no vírus *Influenza* sazonal e que em média cerca de 1/2 dos pacientes internados tiveram pelo menos uma ou mais condições médicas subjacentes (World Health Organization, 2009b). Assim, a morbidade constitui um fator de risco para complicações e formas graves da doença. Segundo esta premissa o presente estudo verificou que, 115 dos indivíduos internados apresentavam morbidades, destes: 98 (85,2%) indivíduos apresentavam doenças pulmonares (por exemplo, asma e DPOC); 8 (7,0%) indivíduos com doença cardíaca (como, insuficiência cardíaca congestiva); 3 (2,6%) com doenças renais (por exemplo, insuficiência renal e transplantes renais); 2 (1,7%) indivíduos com doença hepática, outros 2 (1,7%) com doença oncológica; 1 (0,9%) indivíduo com HIV e 1 (0,9%) com doença metabólica (como, diabetes) (Tabela 2). A infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09, foi confirmada em 43 (6,2%) indivíduos internados com morbidades, distribuindo-se do seguinte modo: patologias pulmonares 39 (90,7%) casos, dos quais; patologias cardíacas 2 (4,7%) casos; patologia hepática 1 (2,3%) caso e 1 (2,3%) casos com patologia metabólica (Tabela 3).

## 10.2. Género

O género parece ter impacto na vulnerabilidade das pessoas à gripe, bem como no curso e resultado da infeção. Assim, o impacto do género no resultado da infeção é influenciado por uma série de fatores globais, sociais e biológicos (World Health Organization, 2010b). Segundo relatórios de observação publicados de pacientes com infeção confirmada pelo vírus A(H1N1)pdm09 em todo o mundo, as taxas de incidência e mortalidade após a infeção parecem diferir entre mulheres e homens. O resultado da infeção com A(H1N1)pdm09 é geralmente pior para as mulheres (Klein, Passaretti, Anker, Olukoya, & Pekosz, 2010).

As avaliações das diferenças entre mulheres e homens nas incidências relatadas de infeção podem ser influenciadas por dois fatores: (1) muitos países não separam os dados por género e idade, o que pode dissimular as diferenças sexuais entre os grupos etários que são mais suscetíveis de serem expostos - crianças e jovens adultos; e (2) as profundas diferenças nos comportamentos de recorrer a um posto de saúde entre as mulheres e os homens (Klein et al., 2010). Este segundo fator foi verificado no presente estudo. Assim, no ano 2009 na RAM, 871 (51,6%) mulheres recorreram a um serviço de saúde, com suspeita de infeção causada pelo vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1), enquanto que 809 (48,0%) foram homens. Os 7 (0,4%) casos onde o sexo é “desconhecido” não seriam suficientes para inverter esta tendência (Tabela 2). Por outro lado, o estudo de Duque et al., realizado no nosso país, verificou que a maior parte dos doentes analisados (56%) eram do sexo masculino.

A frequência de infeção provocada pelo vírus A(H1N1)pdm09 foi confirmada em 347 (50,2%) das mulheres e em 344 (49,8%) dos homens (Tabela 3). Em contraste, três estudos mostraram que a frequência de casos positivos para o vírus A(H1N1)pdm09 foi maior em indivíduos do sexo masculino. Então, segundo o estudo de Klein et al., na Ásia, a maioria dos casos relatados pelo vírus A(H1N1)pdm09 ocorreram no sexo masculino (57,1%); no estudo de Duque et al., a frequência de casos positivos para o sexo masculino foi de 149 (58,4%), em ralação aos 106 (41,6%) casos do sexo feminino. Por último, o estudo de Ribeiro & Gagliani mostrou que, dos 284 casos confirmados de infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09, de abril a junho em São Paulo - Brasil, 149 (52,5%) referem-se ao sexo masculino e 135 (47,5%) ao sexo

feminino. Mais uma vez estes resultados não vão de encontro aos dados aqui apresentados.

### 10.3. Sexo Feminino e Gestação

Glória Martins et al., refere que os efeitos da gravidez na evolução/prognóstico da infecção pelo vírus *Influenza* foram já notados em pandemias anteriores, levando a um aumento da mortalidade neste grupo quando comparado com a restante população. Os autores sugerem ainda que as grávidas têm um risco aumentado de complicações provocadas por este vírus, uma vez que durante a gestação ocorrem alterações no organismo materno, como por exemplo: alterações no sistema imunitário para acomodar o feto em desenvolvimento, diminuindo assim a capacidade de combate às infeções; o aumento do útero ao provocar pressão no diafragma, leva a uma diminuição do volume pulmonar, provocando edema e congestão local que contribuem para o desenvolvimento de pneumonia e do Síndrome da Angústia Respiratória Aguda.

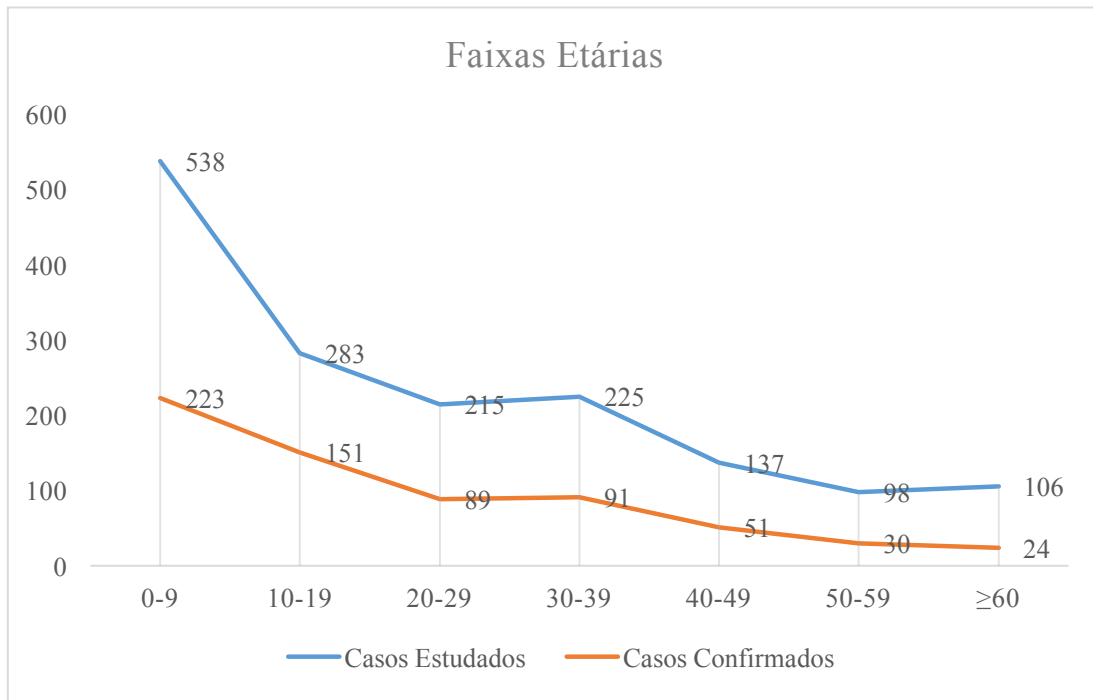
No presente estudo, a infecção pelo vírus da gripe ocorreu em 37 (10,7%) mulheres grávidas (Tabela 3) , levando à morte uma (2,7%) mulher grávida (Tabela 4).

Na publicação de Glória Martins et al., os autores fazem referência a um outro estudo (de Jamieson et al ) que “descreveram 34 pacientes, das quais 1 evoluiu para óbito”, esta proporção é semelhante ao presente estudo. Por outro lado, quando comparado o presente estudo com o de Glória Martins et al., onde os 10 casos de gestantes infetadas, 2 (20,0%) evoluíram para óbito; a proporção é superior neste último. Segundo Klein et al., a grande maioria das mulheres infetadas, em idades reprodutivas, não estavam grávidas, sugerindo que fatores adicionais contribuem para o aumento da incidência de infeção. Um dos fatores adicionais que poderiam contribuir para o aumento da frequência de infeção, era por exemplo a morbilidade. Neste estudo conseguiu-se obter informação que 38 (11,0%) mulheres infetadas tinham morbilidade, das 347 mulheres infetadas. Verificou-se que as doenças pulmonares apresentavam maior frequência de casos (30; 8,6%) (Tabela 12 dos anexos, página 103).

#### 10.4. Faixas Etárias

A Figura 23, mostra o número de casos estudados (linha azul) e os número de casos confirmados de infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 (linha laranja) consoante as faixas etárias. Podemos observar que os números de casos estudados, assim como os números de casos infetados pelo vírus, decrescem com a idade. Encontrámos uma exceção dos indivíduos entre os 30-39 anos, onde o número de casos estudados (225; 13,3%) e o número de casos infetados (91; 13,2%) aumenta ligeiramente em relação à faixa etária dos 20-29 anos (nº de casos estudados: 215; 12,7% e nº de casos infetados: 89; 12,9%). Uma outra exceção compreende a faixa etária dos idosos ( $\geq 60$  anos), onde o número de casos analisados, 106 (6,3%) aumenta ligeiramente em relação à faixa etária dos 50-59 anos, com 98 (5,8%) de casos estudados. Em contrapartida, o número de idosos infetados (24; 3,5%) é inferior aos indivíduos infetados com idades compreendidas entre 50-59 anos (30; 4,3%). Este aspeto dos idosos serem a população com menor frequência de infecção pode pressupor que, provavelmente exista uma pré-imunidade resultante da exposição a vírus *Influenza* que circulavam anteriormente e supõe-se também ainda o fato da população idosa anualmente ser vacinada para o vírus *Influenza*, possa ajudar a criar essa imunidade cruzada (Ronaldo Silveira de Paiva, 2012). O reduzido número de idosos afetados pelo vírus da gripe A, foi demonstrado em estudos serológicos que verificaram a imunidade pré-existente, ou seja, formação de anticorpos para o subtipo do vírus H1N1 que circularam anteriormente a 1950 e que interagem de forma cruzada com o vírus A(H1N1)pdm09, resultando numa proteção, ainda que limitada, contra a infecção provocada por este vírus pandémico (Jhung et al., 2011; Klein et al., 2010). A maioria dos casos de doença grave e mortalidade provocada pelo vírus *Influenza A* sazonal ocorre na população idosa com idades  $\geq 65$  anos. Em contraste, a infecção provocada pelo vírus A(H1N1)pdm09 não foi associada a um grande número de infeções nesta faixa etária, mas tem as maiores taxas de incidência em indivíduos com idades entre 0 e os 40 anos (Klein et al., 2010). Neste estudo, a grande concentração de indivíduos estudados e infetados encontra-se nas idades entre os 0 e os 49 anos. Estes dados são assim sugestivos de um fator importante que favorece uma maior frequência de infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 entre as faixas etárias mais “ativas”. Eventualmente poderá ser atribuído à maior das

atividades profissionais e sociais (viagens e deslocações do dia a dia) (Khdary, Alalem, Turkistan, & Alghamdi, 2014), contribuindo também a inexistência de imunidade na população mais jovem.



**Figura 23** Gráfico representativo da distribuição do número de casos estudados (linha azul) e dos casos confirmados como positivos para o vírus A(H1N1)pdm09 (linha laranja) consoante as faixas etárias, no ano de 2009.

## 10.5. Distribuição Temporal e Distribuição Geográfica

O número e a intensidade das ondas de pandemia provocadas pelo vírus A(H1N1)pdm09 variam substancialmente conforme as regiões geográficas. No México, EUA e no Reino Unido verificou-se uma onda pandémica na primavera de 2009, seguido de uma ou mais ondas durante o verão e outono de 2009. Vários países, particularmente no hemisfério sul, só relataram uma única onda de pandemia em 2009, incluindo Chile, Argentina, Austrália e Nova Zelândia. Outros países da Europa também passaram por uma única onda principal no outono de 2009 (Chowell et al., 2011). No entanto, Amato-Gauci et al., descreve que após a deteção dos casos iniciais importados da América do Norte para a Europa, houve uma onda de transmissão na primavera e no verão na Europa, que afetou a maioria dos países.

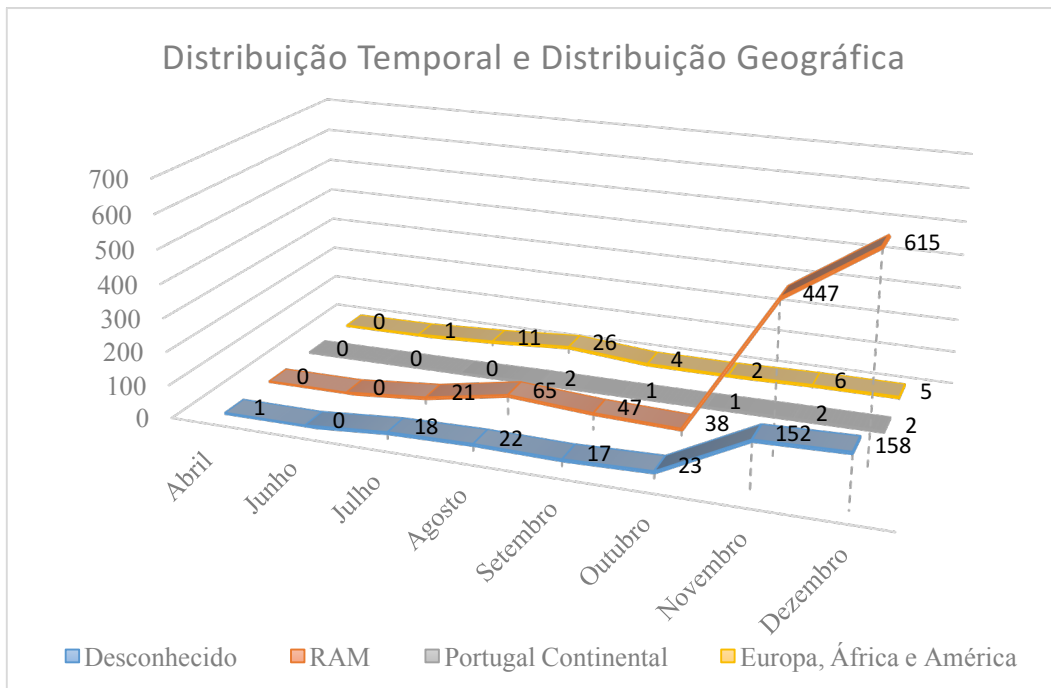
Na RAM, embora não exista o registo do primeiro caso, que ocorreu em abril de 2009, sobre a proveniência da criança e do resultado do diagnóstico, sugere-se que este tenha sido importado ou tenha resultado de um contacto com possíveis indivíduos infetados. Em junho, relatou-se o segundo caso importado na região, por via marítima ou aérea. Este é referente a um cidadão americano com suspeita por infeção pelo vírus pandémico 2009 *Influenza A(H1N1)*, embora o resultado da deteção do vírus fosse “desconhecido” (Figura 24 e Tabela 13 dos anexos, página 104).

A primeira onda de transmissão do vírus ocorre em pleno verão com 115 (6,8%) casos registados no mês de agosto (Figura 18), dos quais 65 (56,5%) recaem na população residente na RAM; 26 (22,6%) na população que visita esta ilha originária do continente Europeu, Africano ou Americano e 2 (1,7%) visitantes residentes em Portugal Continental. Neste mês, a frequência de infeção foi observada em 13 (20,0%) indivíduos residentes na RAM e 4 (15,4%) indivíduos que visitavam a ilha. (Tabela 13 dos anexos, página 104).

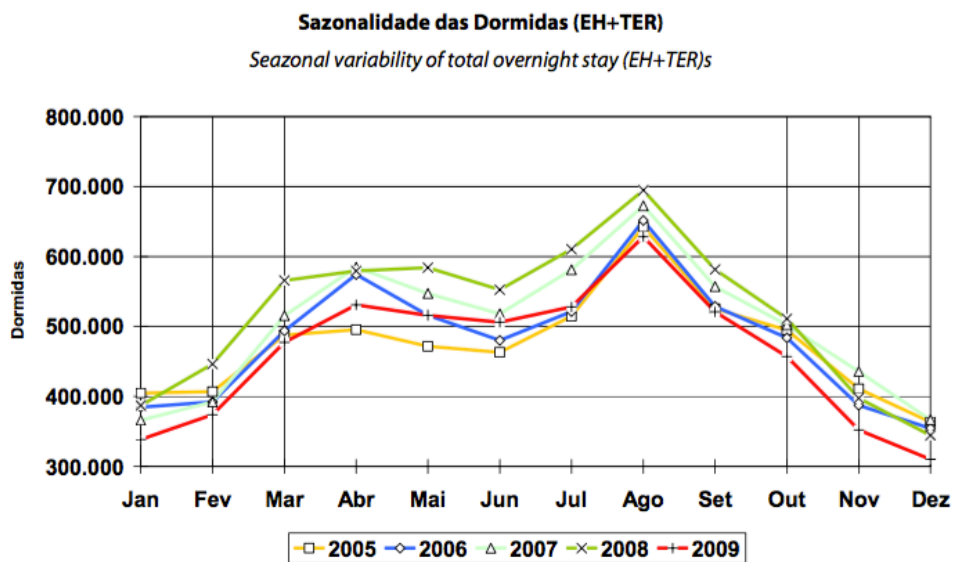
A Figura 24 mostra que ao longo dos meses a frequência de casos estudados, 1233 de residentes na RAM, tende a aumentar, assim como os casos de infeção pelo vírus, atingindo o seu pico no mês de dezembro com 615 (49,9%) casos estudados e 324 (52,7%) casos de infeção. O mês de novembro é o segundo mês com maior número de casos estudados e de infeção registados, 447 (36,2%) e 188 (42,1%) respetivamente (Tabela 13 dos anexos, página 104). Segundo Amato-Gauci et al., verificaram que a

transmissão aumentou no início do outono / inverno, como consequência da reabertura das escolas. Neste trabalho constatou-se que essa premissa seria também válida, mas só foi verificado já no final do outono, somando à reabertura das escolas o regresso ao trabalho, da maioria da população residente na RAM, o que provoca um maior aglomeramento desta nos seus postos de trabalho/ escolas, facilitando a transmissão do vírus. Os meses de setembro e outubro mostraram ser uma exceção a esta tendência de aumento de casos estudados na população residente e ao estudo acima referido. Assim, o mês de setembro apresentou 47 (3,8%) casos estudados e 7 (14,9%) casos de infecção enquanto que o mês de outubro possuía 38 (3,1%) casos estudados e 5 (13,2%) casos de infecção (Tabela 13 dos anexos, página 104). Duas hipóteses podem ser sugeridas: (i) a deslocação da população ativa para fora da região, por motivos de trabalho, estudo ou mesmo férias e (ii) a circulação de indivíduos em espaços abertos.

A Figura 24 indica também que, o mês de agosto foi o mês com maior número de casos estudados referentes à população visitante (26; 47,3%). Esta característica pode ser uma consequência do número de dormidas de turismo na RAM, ser superior no mês de agosto em relação aos outros meses do ano (Figura 25). No entanto, julho mostrou ser o mês como maior número de casos de infecção na população estrangeira (5; 45,4%) e relação ao mês de agosto (4; 15,4%). Esta característica observada, pode supor que os primeiros visitantes da região fossem indivíduos provenientes das mesmas áreas geográficas, onde a frequência da infecção causada pelo vírus A(H1N1)pdm09 estaria já largamente disseminado (Tabela 13 dos anexos, 104).



**Figura 24.** Gráfico representativo da distribuição, em frequência, dos casos estudados ao longo dos meses, consoante a distribuição geográfica.



**Figura 25.** Gráfico representativo da distribuição do turismo, tendo em conta o número de dormidas segundo os meses do ano. Fonte: (Direcção Regional do Turismo, 2010).

## 10.6. Mortalidade por infecção do vírus pandémico 2009 *Influenza*

### A (H1N1)

A frequência de mortalidade provocada por infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09 (Tabela 4) ocorreu nos meses de novembro e dezembro, 2 (20,0%) e 8 (80,0%) óbitos respetivamente, sendo todos os casos registados na população residente na RAM. A mortalidade foi sentida de igual modo em ambos os sexo, com idades  $\geq 20$  anos (Figura 22). Em Portugal a idade mínima de mortalidade foi aos 5 meses e a máxima aos 88 anos, embora a maior percentagem (46,8%) de óbitos fosse sentida na faixa etária entre os 45 a 64 anos. Com 35,5% em idades entre os 15 a 44 anos e apenas com 12,9% (16 caos) em indivíduos com idades  $\geq 65$  anos (Froes, Diniz, Falcão, Nunes, & Catarino, 2010).

Klein et al., verificou que no Brasil e no Peru os casos de letalidade também foram iguais entre mulheres e homens. Enquanto no Canadá o número de óbitos em mulheres foi maior do que nos homens, contrariamente na Austrália a mortalidade foi mais sentida nos homens (58%). Em Portugal, no período compreendido entre abril de 2009 a março de 2010, observou-se uma incidência de 74 mortes no sexo masculino e de 50 mortes no sexo feminino (Froes et al., 2010). Apesar do estudo de Froes et al., incidir num maior período, contradiz a tendência verificada no presente estudo.

A morbidade associada à infecção pelo vírus A(H1N1)pdm09, torna os indivíduos suscetíveis a complicações graves podendo levar à morte. Num estudo publicado em Portugal, que ocorreu de abril de 2009 a agosto de 2010, os autores verificaram que as mortes associadas à infecção por A(H1N1)pdm09 de acordo com fatores de risco, eram mais comuns em doentes com patologias pulmonares e cardíacas (Froes, Diniz, Falcão, Nunes, & Catarino, 2014). Verificando-se o mesmo no presente estudo (embora o período de análise seja mais curto e os dados mais escassos), no qual 7 (70%) dos indivíduos que faleceram: 4 (57,1%) apresentava doença pulmonar; 2 (28,6%) possuía doença cardíaca e 1 (14,3%) era um doente portador de doença metabólica (Tabela 4).

## 11. Conclusão

Obter conclusões de um estudo baseado em dados numéricos retrospectivos, onde a falta de informação torna-se constante, revelou-se uma tarefa arriscada e frágil na avaliação dos resultados obtidos. Contudo, é possível retirar algumas conclusões:

O vírus *Influenza*, mostra ser o vírus com a maior capacidade de disseminação global, causando doenças infecciosas leves a graves a qualquer ser humano, não distinguindo o sexo, faixa etária ou classe social. A sua capacidade de variabilidade genética, provocada por mutações pontuais ou *reassortment* de genes, traz-lhes vantagens sobre os hospedeiros, habilitando-os a voltar a infetar os hospedeiros que anteriormente desenvolveram imunidade. Por parte das entidades responsáveis pela vigilância epidemiológica, torna-se quase impossível prever qual será a próxima mudança genética capaz de provocar uma nova pandemia. Resta-lhes então, trabalhar no sentido de atenuar os efeitos do vírus sobre as populações, através de medidas, como por exemplo: a divulgação de práticas que levam a uma contenção eficaz dos casos de infeção entre a população geral e sobretudo nos profissionais de saúde; bem como o desenvolvimento de novos fármacos e vacinas mais eficazes.

O tempo de resposta ao diagnóstico de infeção foi relevante, pois permitiu por parte dos clínicos a tomada de decisões mais apropriadas, seja na terapêutica a efetuar como no isolamento dos doentes (evitando a transmissão do vírus). Assim o método de diagnóstico eleito pela OMS, RT-qPCR, para identificação da infeção por vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1), mostrou ser eficaz, permitindo dar uma resposta fidedigna aos clínicos em menos de 12 horas.

Embora o género possa ter impacto na vulnerabilidade dos indivíduos a uma série de doenças infecciosas, o impacto do sexo na exposição, suscetibilidade e respostas imunes a infeções agudas, ainda não foi explorado de forma abrangente (World Health Organization, 2010b). Observa-se no presente estudo, que a frequência de infeção no sexo feminino (347; 50,2%) em relação ao sexo masculino (344; 49,8%) não é significativa. No entanto, as taxas de incidência, gravidade e letalidade após a

infecção pelo vírus *Influenza* podem diferir entre homens e mulheres, mas geralmente são dependentes da idade (World Health Organization, 2010b).

Enquanto que o vírus *Influenza* sazonal, infeta preferencialmente a população idosa, o vírus *Influenza* pandémico mostrou ser capaz de infetar a população numa faixa etária mais ampla desde as crianças aos adultos, uma vez que a maioria da população desta faixa etária tem pouca ou nenhuma imunidade pré-existente ao vírus, característica que foi observada neste estudo, onde a faixa etária mais afetada estendeu-se dos 0 aos 49 anos.

Os dois meses com a maior frequência de infecção viral e onde se verificou mortalidade foram novembro e dezembro: 243 casos de infecção com 2 mortes e 388 casos de infecção com 8 mortes, respetivamente. Este número mais elevado de infeções que ocorreram nestes meses poderia se dever à época de inverno e as condições climatéricas não serem favoráveis às pessoas permanecerem em espaços abertos, preferindo os espaços fechados (escolas, trabalhos, centros comerciais, etc), o que levou a uma maior proximidade física dos indivíduos, facilitando a disseminação do vírus por aerossóis, por contacto com objetos contaminados, na proximidade de um aperto de mão e no próprio ar.

A co-morbilidade existente na população provou ser um fator de risco levando a complicações e letalidade quando associadas à infecção viral, observando-se no estudo que a maioria dos indivíduos com morbidades acabaram por falecer, na unidade de cuidados intensivos.

A gravidez, segundo alguns autores, é considerada um fator de risco quando associada à infecção pelo vírus. No presente estudo, não é possível concluir que a gravidez seja um fator de risco. O óbito só ocorreu em uma mulher grávida infetada em relação às quatro mulheres não grávidas infetadas.

A chegada do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) ao arquipélago da Madeira, leva-nos a pensar que ocorreu por meio de um indivíduo que visitava ou regressava à ilha, no mês de abril / junho. Embora, só em julho é que se conseguiu

confirmar laboratorialmente a presença do vírus na região. Desde então a sua disseminação estendeu-se entre a população nativa e visitante

A população da RAM era constituída por 260576 habitantes. Em 2009, ano do presente estudo, verificou-se que 0,5% da população recorreu ao serviço de urgência da região com suspeita por infeção e só 0,2% dos indivíduos encontravam-se infetados por A(H1N1)pdm09. Estes dados sugerem que as medidas preventivas no controlo da propagação da infeção foram eficazes, verificando-se na Figura 12 que a RAM foi a região do país onde se registou uma menor atividade viral. Comparativamente aos dois anos seguintes, verificou-se que 0,2% da população deslocou-se ao serviço de urgência com síndrome gripal sugestivo de infeção pelo vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1). O diagnóstico foi confirmado em 0,1% da população (Tabela 14 dos anexos, página 104), dados que sugerem que a atividade do vírus *Influenza* na ilha da Madeira diminuiu com o tempo à medida que o número de indivíduos com imunidade ao vírus aumentou.

## 12. Anexos

### 12.1. Kit Transport Medium da Vircell

**Tabela 5.** Conteúdo e composição do kit *transport Medium* da *Vircell* (Vircell, 2012).

<b>Conteúdo</b>	<b>Composição</b>
1 x Tubo de tampa roscada	2 mL de meio de transporte composto por: solução de Hank's BSS, HEPES, BSA, Gelatina, Sacarose, Antibióticos.
2 x Zaragatoa estéril	

12.2. Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit da QIAGEN®

**Tabela 6.** Componentes; Unidades/ Volumes e Preparação dos reagentes / Observações, dos constituintes do Kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit da QIAGEN®*, utilizados na extração manual do RNA viral do vírus pandêmico 2009 *Influenza A (H1N1)* para 50 reações (QIAGEN, 2014).

<b>Componentes</b>	<b>Unidade / Volume</b>	<b>Preparação dos Reagentes / Observações</b>
QIAamp Mini Colunas de extração	50 uni.	<u>Observação:</u> possuem uma membrana à base de sílica.
Tubos coletores de 2 mL	200 uni.	
Tampão AVL	31 mL	<u>Observação:</u> tampão de Lise, na sua constituição está presente proteinase.
Tampão AW1 (concentrado)	19 mL	<u>Preparação:</u> adicionar no próprio frasco do tampão AW1 25 mL de etanol a 96% <u>Observação:</u> Tampão de lavagem. Eliminação de contaminantes.
Tampão AW2 (concentrado)	13 mL	<u>Preparação:</u> adicionar no próprio frasco do tampão AW2 30 mL de etanol a 96% <u>Observação:</u> Tampão de lavagem. Elimina contaminantes
Tampão AVE	3x2 mL	<u>Observação:</u> tampão de eluição. É uma água isenta de RNase, que contem 0,04% de azida de sódio para prevenir o crescimento microbiano e posterior contaminação com RNases.
RNA Carrier (liofilizado)	310 µG	<u>Preparação:</u> adicionar 1 mL de tampão AVE ao tubo que contem RNA <i>carrier</i> liofilizado. Dissolver por agitação no vortex. Transferir a solução para o frasco do tampão AVL. Homogeneizar no vortex. Aliquotar com 560 µL. <u>Observação:</u> durante o procedimento de purificação o RNA <i>carrier</i> possui duas funções; primeiro melhora a ligação dos ácidos nucleicos virais à superfície de sílica das partículas magnéticas, especialmente se as amostras possuírem um número baixo de moléculas alvo e segundo reduz a probabilidade das RNases não

Manual	1 uni.	serem desnaturadas pelos sais caotrópicos e o tampão de lise.
--------	--------	---

### 12.3. Kit EZ1 Vírus Mini Kit v2.0 da QIAGEN®

**Tabela 7.** Componentes; Unidades/ Volumes e Preparação dos reagentes / Observações, dos constituintes do Kit *EZ1 Vírus Mini Kit v2.0* da QIAGEN®, utilizados na extração automática através do equipamento *EZ1 Advanced* do RNA viral do vírus pandémico 2009 *Influenza A* (H1N1) para 48 preparações (QIAGEN, 2010).

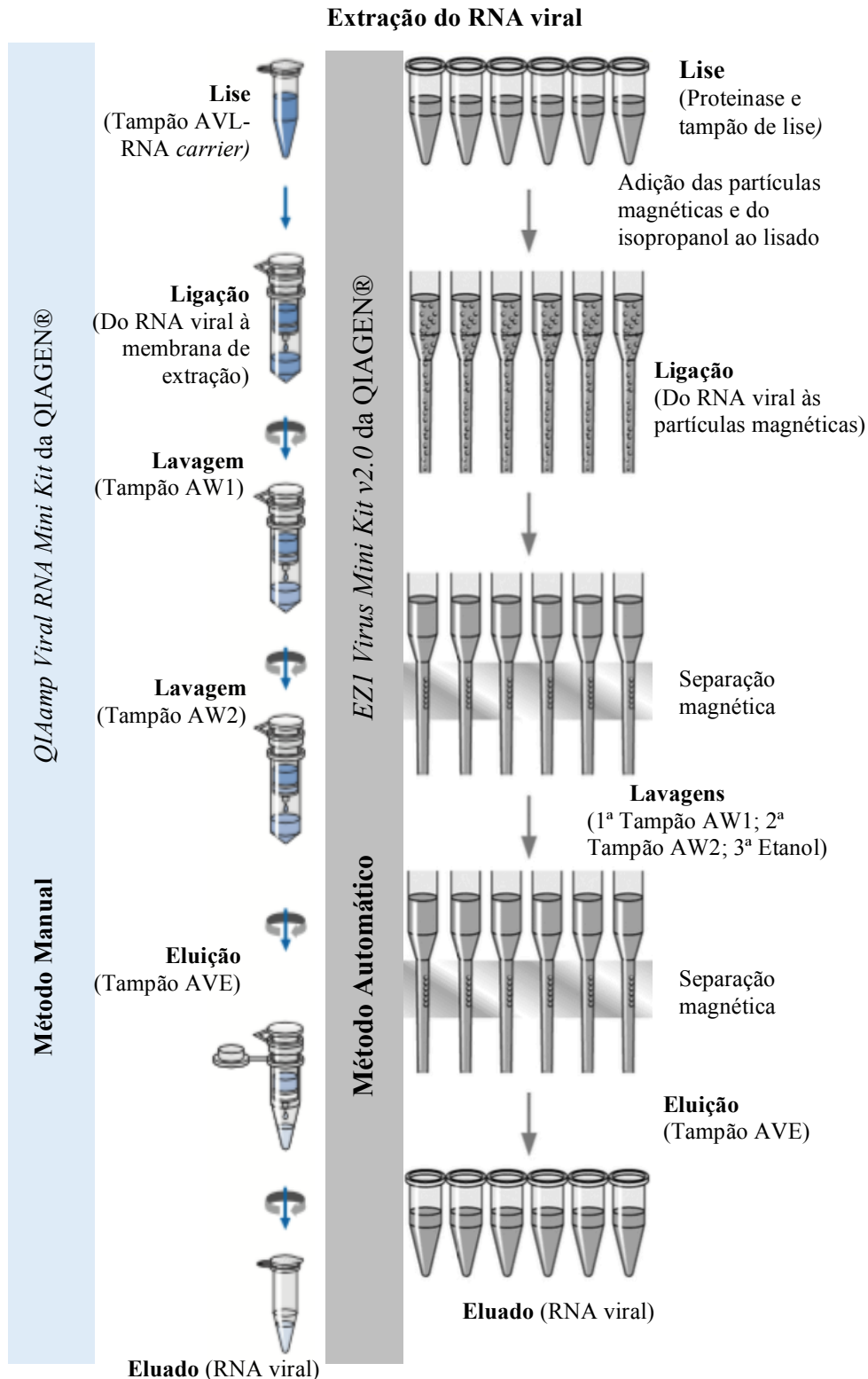
Componentes	Unidades / Volumes	Preparação dos Reagentes / Observações
Cartuchos de reagente, Vírus Mini v2.0	48	<u>Observação:</u> um único cartucho de reagente fornece em cada poço, os reagentes necessários a purificação de ácidos nucleicos de uma única amostra, por exemplo: partículas magnéticas, tampão de lise, tampão de lavagem e tampão de eluição (AVE), exceto o RNA <i>carrier</i> que é adicionado num tubo à parte.
Suporte descartável de pontas	50 uni.	
Pontas descartáveis com filtro	50 uni.	
Tubos de amostra (2 ml)	100 uni.	
Tubos de eluição (1,5 ml)	100 uni.	
RNA <i>carrier</i> (liofilizado)	310 µG	<u>Preparação:</u> reconstituir os 310 µG de RNA <i>carrier</i> em 5,170 mL de tampão AVE. Homogeneizar no vórtex e alíquotar com 60 µL da solução. Guardar a 2-8°C até 6 semanas.
Tampão AVE	3 x 2 mL	
Cartão-Q	1 uni.	
Manual	1 uni.	

12.4. *Kit AgPath-ID<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR da Applied Biosystems*

**Tabela 8.** Componentes, volumes e composição dos reagentes presentes no kit *AgPath-ID<sup>TM</sup> One-Step RT-PCR* da Applied Biosystems, utilizado na detecção do RNA do vírus pandêmico 2009 *Influenza A* (H1N1) (Applied Biosystems®, 2009).

Componentes	Volume	Composição
<b>Tampão RT-PCR</b>	2 x 7 mL	<u>ROX<sup>TM</sup></u> (corante inerte, cuja fluorescência não se altera durante a reação em cadeia da polimerase em tempo real, tem como função normalizar as diferenças de poço para poço que podem ocorrer devido a artefactos como erros de pipetagem ou limitações de instrumento).
<b>Mix Enzima RT-PCR</b>	25 x 550 µL	<u>Transcriptase reversa ArrayScript<sup>TM</sup></u> (enzima obtida a partir de uma estirpe de <i>E. Coli</i> sobre-expressa uma versão de engenharia do gene <i>pol</i> (genótipo cromossomal bacteriano da síntese da DNA polimerase) da M-MLV) <u>DNA polimerase AmpliTaqGold®</u> (DNA polimerase recombinante, termostável, de 94kDa, codificada por uma modificada do gene da DNA polimerase da <i>Thermus aquaticus</i> ).
<b>Água livre de nucleases</b>	25 mL	

12.5. Esquema de extração do RNA do vírus



**Figura 26. Esquema de extração de ácidos nucleicos.** À esquerda, extração do RNA viral pelo método manual pelo *kit QIAamp Viral RNA Mini Kit* da QIAGEN® (QIAGEN, 2014). À direita, extração do RNA viral pelo método automático com o *kit EZ1 Virus Mini Kit v2.0* da QIAGEN® (QIAGEN, 2010).

12.6. *Kit TaqMan<sup>TM</sup> Influenza A (H1N1) Assay Set*

**Tabela 9.** Componentes, sondas, *primers*, volumes, concentrações e sequencia nucleotidica de 5' > 3', presentes no *Kit TaqMan<sup>TM</sup> Influenza A (H1N1) Assay Set* da *Applied Biosystems*, utilizado na detecção do RNA do vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)*. (1) Sondas marcadas na extremidade 5' com a molécula *reporter* 6-carboxifluoresceína (FAM) e o *quencher* BHQ1 na extremidade 3'. (2) Sondas marcadas na extremidade 5' com a molécula *reporter* 6-carboxifluoresceína (FAM) e internamente na base "T" o *quencher* BHQ1, estando a extremidade 3' alterada evitando a extensão da sonda pela Taq polimerase (World Health Organization, 2009a).

Componentes	Primers e Sondas	Volume / Concentração	Sequencia (5' > 3')
<i>TaqMan<sup>TM</sup> Influenza A Assay (Set 1)</i>	InfA <i>primer Forward</i>	50 µL/40 µM	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C
	InfA <i>primer Reverse</i>	50 µL/40 µM	AGG GGA TTY YGG ACA AAK CGT CTA
	InfA Sonda <sup>1</sup>	50 µL/10 µM	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG
<i>TaqMan<sup>TM</sup> Influenza A (H1N1) Assay (Set 2)</i>	SW InfA <i>primer Forward</i>	50 µL/40 µM	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG
	SW InfA <i>primer Reverse</i>	50 µL/40 µM	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC
	SW Inf A Sonda <sup>2</sup>	50 µL/10 µM	CYA CTG CAA GCC CA"TT" ACA CAC AAG CAG GCA
<i>TaqMan<sup>TM</sup> Influenza A (H1N1) Subtype H1 Assay (Set 3)</i>	SW H1 <i>primer Forward</i>	50 µL/40 µM	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA
	SW H1 <i>primer Reverse</i>	50 µL/40 µM	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC
	SW H1 Sonda <sup>2</sup>	50 µL/10 µM	CA GAA TAT ACA "T"CC RGT CAC AAT TGG ARA A
<i>TaqMan<sup>TM</sup> RNase P Assay (Set 4)</i>	RNaseP <i>primer Forward</i>	50 µL/40 µM	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G
	RNaseP InfA <i>primer Reverse</i>	50 µL/40 µM	GAG CAA CTG TCT CCA CAA GT
	RNaseP Sonda <sup>1</sup>	50 µL/10 µM	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG

## 12.7. Preparação das *MasterMix* para protocolo de detecção dos ácidos nucleicos

**Tabela 10.** Tabela de preparação das *MasterMix*. Soluções utilizadas e respetivos volumes na preparação de cada *MasterMix* (1, 2, 3 e 4) segundo o número de rações a processar. O número de reações foi determinado pela soma de: número total de amostras, o controlo negativo (NTC), o controlo positivo (PC) e mais uma reação (erros de pipetam).

Nº de Reações (nº de amostras + NTC + PC + 1)	Kit <i>AgPath-IDTM One-Step RT-PCR</i>			Kit <i>TaqMan™</i> <i>Influenza A</i> <i>(H1N1) Assay Set</i>
	Água livre de nucleases (µL)	Tampão RT-PCR (µL)	Mix Enzima (µL)	Sondas e <i>Primers</i> (µL)
1	6	12,5	1	0,5
2	12	25	2	1
3	18	37,5	3	1,5
...	...	...	...	...
25	150	312,5	25	12,5

## 12.8. Esquema de pipetagem da microplaca de 96 poços utilizada em RT-qPCR

**Tabela 11.** Esquematização do modo de pipetar a microplaca com 96 poços para a detecção do vírus pandémico *Influenza A* (H1N1) 2009. Por coluna foram pipetadas 20 µL de cada *MasterMix* e por linhas 5 µL do CP, NTC e amostras.

	1	2	3	4	...	12
	MM <i>InfA</i> (1)	MM <i>swInfA</i> (2)	MM <i>swHI</i> (3)	MM <i>RNase</i> (4)		
A	CP	CP	CP	CP		
B	NTC	NTC	NTC	NTC		
C	1ªAmostra	1ªAmostra	1ªAmostra	1ªAmostra		
D	2ªAmostra	2ªAmostra	2ªAmostra	2ªAmostra		
E	3ªAmostra	3ªAmostra	3ªAmostra	3ªAmostra		
F	...	...	...	...		
G	...	...	...	...		
H	6ªAmostra	6ªAmostra	6ªAmostra	6ªAmostra		

## 12.9. Tabelas de frequências dos resultados estatísticos

### 12.9.1. Tabela de frequência e de percentagem da morbilidade consoante o género

**Tabela 12.** Tabela de frequências e de percentagem, da morbilidade e morbilidade em caso de infeção pelo vírus A(H1N1)pdm09 consoante género.

Morbilidade	Género							
	Masculino				Feminino			
	Nº casos 809		Nº casos de infeção 344		Nº casos 871		Nº casos de infeção 347	
Nº casos	%	Nº casos	%	Nº casos	%	Nº casos	%	
<b>Desconhecida</b>	711	87,9	296	86,0	771	88,5	309	89,0
<b>D. Pulmonar</b>	64	7,9	32	9,3	70	8,0	30	8,6
<b>D. Renal</b>	5	0,6	1	0,3	4	0,4	0	0,0
<b>D. Cardiovascular</b>	8	1,0	3	0,9	4	0,4	1	0,3
<b>D. Hepática</b>	4	0,5	2	0,6	1	0,1	0	0,0
<b>D. Hematológica</b>	2	0,2	2	0,6	0	0,0	0	0,0
<b>D. Oncológica</b>	2	0,2	1	0,3	5	0,6	2	0,6
<b>Imunodeprimidos</b>	2	0,2	2	0,6	5	0,6	1	0,3
<b>Obesidade</b>	2	0,2	2	0,6	1	0,1	0	0,0
<b>Má Nutrição</b>	1	0,1	1	0,3	1	0,1	0	0,0
<b>HIV</b>	4	0,5	2	0,6	1	0,1	0	0,0
<b>D. Metabólica</b>	0	0,0	0	0,0	7	0,8	3	0,9
<b>D. Neurológica</b>	4	0,5	0	0,0	1	0,1	1	0,3

12.9.2. Tabela de frequência da distribuição geográfica relativamente à distribuição temporal

**Tabela 13.** Tabela de frequências, dos casos estudados e infetados tendo em conta a distribuição geográfica consoante a distribuição temporal.

Distribuição Geográfica		Distribuição Temporal							
		Abr.	Jun.	Jul.	Ago.	Set.	Out.	Nov.	Dez.
<b>RAM</b> (1233 casos estudados; 544 casos infetados)	Nº Casos Estudado	0	0	21	65	47	38	447	615
	Nº Casos Infetados	0	0	7	13	7	5	188	324
<b>Portugal Continental</b> (8 casos estudados; 2 casos infetados)	Nº Casos Estudado	0	0	0	2	1	1	2	2
	Nº Casos Infetados	0	0	0	0	0	1	1	0
<b>Europa, África e América</b> (55 casos estudados; 12 casos infetados)	Nº Casos Estudado	0	1	11	26	4	2	6	5
	Nº Casos Infetados	0	0	5	4	0	1	2	0

12.9.3. Tabela de frequência do diagnóstico do vírus A(H1N1)pdm09 de 2010 a 2012.

**Tabela 14.** Tabela de frequências e percentagem, do resultado do diagnóstico do vírus pandémico 2009 *Influenza A (H1N1)* no período de 2010 a 2012, na RAM.

Resultado do diagnóstico para vírus A(H1N1)pdm09	Frequência (nº de casos)	Percentagem %
<b>Negativo</b>	422	61,4
<b>Positivo</b>	264	38,4
<b>Duvidoso</b>	1	0,1
<b>Total</b>	687	100

## 12.10. Formulários da Gripe OT-3



**Gripe OT-3**  
Orientações Técnicas  
Profissionais de saúde

**Actualizado em 07-07-2009\***

### **Doença pelo vírus da gripe A(H1N1)v**

**Fase Pandémica 6 - OMS**

### **Declaração de caso em investigação\***

Esta Declaração deverá ser preenchida pelo médico responsável pela **primeira avaliação clínica no Hospital de Referência**, devendo ser enviada, de imediato, por fax, para a Direção-Geral da Saúde<sup>1</sup> e para o Delegado de Saúde Regional da área do hospital.

A declaração (**completamente preenchida**) deverá também ser utilizada no envio dos produtos biológicos ao Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe<sup>2</sup> (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge).

**Deve ter-se em atenção o cumprimento das medidas de protecção individual durante a observação do doente (Gripe OT-11).**

**Nº de caso:**  
(A preencher pela DGS)

Declaração preenchida em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_; \_\_ h \_\_ m

#### **1. Identificação do médico**

Nome do médico \_\_\_\_\_  
Hospital \_\_\_\_\_ Serviço \_\_\_\_\_  
Telemóvel \_\_\_\_\_ Telefone \_\_\_\_\_ Fax: \_\_\_\_\_  
e-mail \_\_\_\_\_

#### **2. Identificação do doente**

Nome do doente: \_\_\_\_\_ Telemóvel \_\_\_\_\_  
Nascimento: \_\_/\_\_/\_\_\_\_ Idade (anos/ meses, se <2 anos): \_\_\_\_ Desconhecido  
Sexo: Masculino Feminino Local residência \_\_\_\_\_

#### **3. Quadro clínico da doença**

<b>3.1. Clínica</b>	
Início de sintomas __/__/____	Febre $\geq$ 38°C (confirmada) Início __/__/____; __ h
Tosse	Mialgias
Cefaleias	Artralgias
Odinofagia	Vómitos
Rinorreia	Diarreia
Pneumonia	Náuseas
Dispneia	Conjuntivite
Epistaxis	
Espirros	
Outro(s):	

<sup>1</sup> Fax nº 21 843 0655

<sup>2</sup> Telefone nº 21 752 6455 ou 21 751 9216 ou 911000612

\*Documento sujeito a actualização, apresentando-se as últimas alterações a letra azul.

1

12.11. Folha de trabalho do registo das amostras e resultado

**GRIPE A (H1N1)v\_PCR**

DATA: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

CORRIDA Nº \_\_\_

Nome: _____ Processo: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Local de Observação: _____ Produto Biológico: _____ Critério de Inv. Lab.: _____ Terapêutica antiviral: _____	
--	--

Nome: _____ Processo: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Local de Observação: _____ Produto Biológico: _____ Critério de Inv. Lab.: _____ Terapêutica antiviral: _____	
--	--

Nome: _____ Processo: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Local de Observação: _____ Produto Biológico: _____ Critério de Inv. Lab.: _____ Terapêutica antiviral: _____	
--	--

Nome: _____ Processo: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Local de Observação: _____ Produto Biológico: _____ Critério de Inv. Lab.: _____ Terapêutica antiviral: _____	
--	--

Nome: _____ Processo: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Local de Observação: _____ Produto Biológico: _____ Critério de Inv. Lab.: _____ Terapêutica antiviral: _____	
--	--

### 13. Referências bibliográficas

2009 flu pandemic in Portugal. (2017, Junho 18). Em *Wikipedia*. Obtido de [https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=2009\\_flu\\_pandemic\\_in\\_Portugal&oldid=786300731](https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=2009_flu_pandemic_in_Portugal&oldid=786300731)

Aldigs, E. K. (2014). *Notes On Medical Virology What You Really Need To Know*. OMICS Group International. Obtido de [www.esciencecentral.org/ebooks](http://www.esciencecentral.org/ebooks)

Amato Gauci AJ, Zucs P, Snacken R, Ciancio B, Lopez V, Broberg E, ... Nicoll A. (2010). *The 2009 A(H1N1) pandemic in Europe: a review of the experience*. (Europäisches Zentrum für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten, Ed.). Luxembourg: Publ. Off.

Amato-Gauci, A., Zucs, P., Snacken, R., Ciancio, B. C., Lopez, V., Broberg, E., Nicoll, A. (2011). Surveillance trends of the 2009 influenza A (H1N1) pandemic in Europe. Obtido de <http://edoc.rki.de/docviews/abstract.php?lang=ger&id=1418>

Applied Biosystems® (Ed.). (2009). AgPath-IDTM One-Step RT-PCR Kit Core Reagents for One-Step qRT-PCR Detection of Pathogen Protocol.

Black Hole Quencher® Dyes | LGC Biosearch Technologies. (sem data). Obtido de <https://www.biosearchtech.com/support/education/fluorophores-and-quencher/black-hole-quencher-dyes>

Bustin, S. A., & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, *109*(4), 365–379. <https://doi.org/10.1042/CS20050086>

Carneiro, M., Trench, F. J. P., Waib, L. F., Pedro, F. L., & Motta, F. (2010). Influenza H1N1 2009: revisão da primeira pandemia do século XXI. *Rev AMRIGS*, *54*(2), 206–13.

Chowell, G., Echevarría-Zuno, S., Viboud, C., Simonsen, L., Tamerius, J., Miller, M. A., & Borja-Aburto, V. H. (2011). Characterizing the Epidemiology of the 2009 Influenza A/H1N1 Pandemic in Mexico. *PLoS Medicine*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000436>

Correia, A. M., Queirós, L., & Dias, J. (2010). Pandemia de gripe A (H1N1) no Norte de Portugal: características da onda de Outono/Inverno. *Revista Portuguesa de Pneumologia*, 16(6), 880–886.

Glória Martins, M., Pinto, K. L., Santos-Júnior, O. M., Dudek, M. I. R., Wakiyama, T. P., & dos Santos, R. M. (2013). INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A H1N1 EM GESTANTES/INFLUENZA A H1N1 VIRUS INFECTION IN PREGNANT WOMEN. *Revista de Pesquisa em Saúde*, 13(1). Obtido de <http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/revistahuufma/article/view/1236>

Ladeira, P. R. S., Isaac, C., & Ferreira, M. C. (2011). Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real. *Revista de Medicina*, 90(1), 47–51.

Ducatez, M. F., Pelletier, C., & Meyer, G. (2015). Influenza D Virus in Cattle, France, 2011–2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21(2). <https://doi.org/10.3201/eid2102.141449>

Duque, V., Cordeiro, E., Mota, V., Vaz, J., Morais, C., Rodrigues, F., ... Meliço-Silvestre, A. (2010). The early days of pandemic (H1N1) 2009 virus infection in the central region of Portugal. *Revista Portuguesa de Pneumologia (English Edition)*, 16(6), 870–879.

Eisfeld, A. J., Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2014). At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews Microbiology*, 13(1), 28–41. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3367>

FAM (6-FAM) Oligo Modifications from Gene Link. (sem data). Obtido 2 de Setembro de 2017, de [http://www.genelink.com/newsite/products/mod\\_detail.asp?modid=33](http://www.genelink.com/newsite/products/mod_detail.asp?modid=33)

Farrell, R. E. (2010). *RNA methodologies: a laboratory guide for isolation and characterization* (4th ed). Amsterdam: Elsevier, Academic.

Forleo-Neto, E., Halker, E., Jorge Santos, V., Maria Paiva, T., & Toniolo-Neto, J. (2003). Influenza. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(2), 267–274.

Froes, F., Diniz, A., Falcão, I., Nunes, B., & Catarino, J. (2010). Óbitos por gripe pandémica A (H1N1) 2009 em Portugal Período de Abril de 2009 a Março de 2010. *Revista Portuguesa de Medicina Intensiva*, 11–19.

Froes, F., Diniz, A., Falcão, I., Nunes, B., & Catarino, J. (2014). Final report on the mortality from flu pandemic (H1N1) 2009 in Portugal (April 2009–August 2010). *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 32(1), 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2014.01.003>

George, F., Leça, A., Diniz, A., Rodrigues, B., Orta Gomes, C., Sena, C., ... Gomes, S. (2010). *Relatório da Pandemia da Gripe em Portugal 2009 (H1N1)*. Lisboa. Obtido de [www.dgs.pt](http://www.dgs.pt)

Gibbs, A. J., Armstrong, J. S., & Downie, J. C. (2009). From where did the 2009 «swine-origin» influenza A virus (H1N1) emerge? *Virology Journal*, 6(1), 207. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-207>

Guiomar, R., Pechirra, P., Gonçalves, P., Arraiolos, A., Conde, P., Nunes, B., ... Furtado, C. (2012). Contribution of the Portuguese Laboratory Network for the Diagnosis of Influenza A (H1N1) pdm09 Infection during the 2009/2010 and 2010/2011 influenza seasons. *Eurosurveillance*. Obtido de <http://repositorio.insa.pt/handle/10400.18/986>

Gurtler, L. (2006). Virology of Human Influenza. Em *Influenza Report 2006* (pp. 87–91). Paris: Flying Publisher. Obtido de <http://www.influenzareport.com/>

Han, T., & Marasco, W. A. (2011). Structural basis of influenza virus neutralization: Antibodies to influenza A hemagglutinin. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1217(1), 178–190. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05829.x>

Hause, B. M., Collin, E. A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., ... Li, F. (2014). Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. *mBio*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00031-14>

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986–994. <https://doi.org/10.1101/gr.6.10.986>

Hilleman, M. R. (2002). Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine*, 20(25), 3068–3087. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00254-2](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00254-2)

Humphries, M. O. (2005). The Horror at Home: The Canadian Military and the «Great» Influenza Pandemic of 1918. *Journal of the Canadian Historical Association*, 16(1), 235. <https://doi.org/10.7202/015733ar>

Jhung, M. A., Swerdlow, D., Olsen, S. J., Jernigan, D., Biggerstaff, M., Kamimoto, L., ... Finelli, L. (2011). Epidemiology of 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 52(Supplement 1), S13–S26. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq008>

Juno, J., Fowke, K. R., & Keynan, Y. (2011). *Epidemiology of the 2009 Pandemic Influenza A (H1N1)*. National Collaborating Centre for Infectious Diseases.

Kamps, B. S., Hoffmann, C., Preiser, W., & Behrens, G. (2006). *Influenza report, 2006*. Paris: Flying Publisher. Obtido de <http://www.influenzareport.com/>

Khdary, N. H., Alalem, M. A., Turkistan, A. M., & Alghamdi, S. S. (2014). An Epidemiological Study on Influenza A(H1N1) in Makkah. *Advances in Infectious Diseases*, 4(4), 198–206. <https://doi.org/10.4236/aid.2014.44028>

Kilbourne, E. D. (2006). Influenza Pandemics of the 20th Century. *Emerging Infectious Diseases*, 12(1), 9–14. <https://doi.org/10.3201/eid1201.051254>

Klein, S. L., Passaretti, C., Anker, M., Olukoya, P., & Pekosz, A. (2010). The impact of sex, gender and pregnancy on 2009 H1N1 disease. *Biology of Sex Differences*, 1, 5. <https://doi.org/10.1186/2042-6410-1-5>

Krejcová, L., Michálek, P., Hynek, D., Adam, V., & Kizek, R. (2015). Structure of influenza viruses, connected with influenza life cycle. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*, 1, 13–19.

Liu, C. (1994). Influenza. Em *Infectious Diseases: A treatise of infectious processes* (5.<sup>a</sup> ed., pp. 388–393). Philadelphia: J. B. Lippincott Company.

Mackenzie, J. S., Kelso, A., & Hampson, A. W. (2014). Influenza. *Microbiology Australia*, 35(3), 133. <https://doi.org/10.1071/MA14045>

Martín-Benito, J., & Ortín, J. (2013). Influenza Virus Transcription and Replication. Em *Advances in Virus Research* (Vol. 87, pp. 113–137). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407698-3.00004-1>

Matsuoka, Y., Matsumae, H., Katoh, M., Einfeld, A. J., Neumann, G., Hase, T., others. (2013). A comprehensive map of the influenza A virus replication cycle. *BMC systems biology*, 7(1), 97.

Matsuzaki, Y., Katsushima, N., Nagai, Y., Shoji, M., Itagaki, T., Sakamoto, M., Nishimura, H. (2006). Clinical features of influenza C virus infection in children. *The Journal of infectious diseases*, 193(9), 1229–1235.

Mello, W. A. de. (2010). The role of laboratory diagnosis of influenza. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 1(1). <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000100027>

Mpolya, E. A., Furuse, Y., Nukiwa, N., Suzuki, A., Kamigaki, T., & Oshitani, H. (2009). Pandemic (H1N1) 2009 virus viewed from an epidemiological triangle model. *JDR I*, 4(5), 356–364.

Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H., & Barman, S. (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus research*, 143(2), 147–161. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.05.010>

Neumann, G., Noda, T., & Kawaoka, Y. (2009). Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, 459(7249), 931–939. <https://doi.org/10.1038/nature08157>

Obuchi, M., Adachi, Y., Takizawa, T., & Sata, T. (2013). Influenza A(H1N1)pdm09 virus and asthma. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00307>

Olga I. Kosoy, Amy J. Lambert, Dana J. Hawkinson, Daniel M. Pastula, Cynthia S. Goldsmith, D. Charles Hunt, & J. Erin Staples. (2015). Novel Thogotovirus Associated with Febrile Illness and Death, United States, 2014 - Volume 21, Number 5—May 2015 - Emerging Infectious Disease journal - CDC. <https://doi.org/10.3201/eid2105.150150>

Paul D. Hoepflich, M. Colin Jordan, & Allan R. Ronald (Eds.). (1994). *Infectious Diseases - A treatise of infectious processes* (5th Edition). J. B. Lippincott Company.

Petric, M., Comanor, L., & Petti, C. A. (2006). Role of the Laboratory in Diagnosis of Influenza during Seasonal Epidemics and Potential Pandemics. *The Journal of Infectious Diseases*, 194(s2), S98–S110. <https://doi.org/10.1086/507554>

Presti, R. M., Zhao, G., Beatty, W. L., Mihindukulasuriya, K. A., Travassos da Rosa, A. P. A., Popov, V. L., ... Wang, D. (2009). Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad Viruses Are Novel Members of the Family Orthomyxoviridae. *Journal of Virology*, 83(22), 11599–11606. <https://doi.org/10.1128/JVI.00677-09>

QIAGEN (Ed.). (2010, Abril). EZ1® Virus Mini Handbook.

QIAGEN (Ed.). (2014, Dezembro). QIAamp® Viral RNA Mini Handbook.

Resa-Infante, P., Jorba, N., Coloma, R., & Ortin, J. (2011). The influenza virus RNA synthesis machine: Advances in its structure and function. *RNA Biology*, 8(2), 207–215. <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.14513>

Rhedin, S., Hamrin, J., Naucler, P., Bennet, R., Rotzén-Östlund, M., Färnert, A., & Eriksson, M. (2012). Respiratory Viruses in Hospitalized Children with Influenza-Like Illness during the H1n1 2009 Pandemic in Sweden. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051491>

Rhim, J.-W., Go, E.-J., Lee, K.-Y., Youn, Y.-S., Kim, M.-S., Park, S. H., ... Kang, J.-H. (2012). Pandemic 2009 H1N1 virus infection in children and adults: A cohort study at a single hospital throughout the epidemic. *International Archives of Medicine*, 5, 13. <https://doi.org/10.1186/1755-7682-5-13>

Ribeiro, T. R., & Gagliani, L. H. (2014). Epidemiologia e diagnóstico laboratorial do vírus influenza a-subtipo H1N1. *UNILUS Ensino e Pesquisa*, 11(22), 5–22.

Ronaldo Silveira de Paiva. (2012). *EPIDEMIA DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A/H1N1 EM MUNICÍPIOS DO NORTE DO PARANÁ EM 2009* (Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Coletiva da

Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre). Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

Salomon, R., & Webster, R. G. (2009). The Influenza Virus Enigma. *Cell*, *136*(3), 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.029>

Samji, T. (2009). Influenza A: understanding the viral life cycle. *Yale J Biol Med*, *82*(4), 153–159.

Sandbulte, M., Spickler, A., Zaabel, P., & Roth, J. (2015). Optimal Use of Vaccines for Control of Influenza A Virus in Swine. *Vaccines*, *3*(1), 22–73. <https://doi.org/10.3390/vaccines3010022>

Sandt, C. E. van de, Kreijtz, J. H. C. M., & Rimmelzwaan, G. F. (2012). Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses. *Viruses*, *4*(9), 1438–1476. <https://doi.org/10.3390/v4091438>

Saunders-Hastings, P. R., & Krewski, D. (2016). Reviewing the History of Pandemic Influenza: Understanding Patterns of Emergence and Transmission. *Pathogens*, *5*(4), 66. <https://doi.org/10.3390/pathogens5040066>

Schmolke, M., & García-Sastre, A. (2010). Evasion of innate and adaptive immune responses by influenza A virus: Immune evasion by influenza A viruses. *Cellular Microbiology*, *12*(7), 873–880. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01475.x>

Sorrell, E. M., Schrauwen, E. J. A., Linster, M., De Graaf, M., Herfst, S., & Fouchier, R. A. M. (2011). Predicting «Airborne» Influenza Viruses: (Trans-)mission Impossible? *Current Opinion in Virology*, *1*(6), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.07.003>

Szewczyk, B., Bienkowska-Szewczyk, K., & Król, E. (2014). Introduction to molecular biology of influenza A viruses. *Acta Biochim Pol*, *61*(3), 397–401.

Taubenberger, J. K. (1998). Influenza virus hemagglutinin cleavage into HA1, HA2: No laughing matter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(17), 9713–9715.

Taubenberger, J. K., & Kash, J. C. (2010). Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host & Microbe*, 7(6), 440–451. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.009>

Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2008). The pathology of influenza virus infections. *Annu. Rev. pathmechdis. Mech. Dis.*, 3, 499–522.

Taubenberger, J. K., & Morens, D. M. (2010). Influenza: the once and future pandemic. *Public health reports*, 125(3 suppl), 15–26.

Tscherne, D. M., & García-Sastre, A. (2011). Virulence determinants of pandemic influenza viruses. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(1), 6–13. <https://doi.org/10.1172/JCI44947>

Types of Influenza Viruses | Seasonal Influenza (Flu) | CDC. (2017, Setembro 27). Obtido 29 de Outubro de 2017, de <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>

Velthuis, A. J. W. te, & Fodor, E. (2016). Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), 479–493. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.87>

Vemula, S. V., Zhao, J., Liu, J., Wang, X., Biswas, S., & Hewlett, I. (2016). Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/v8040096>

Vircell (Ed.). (2012, Junho). VIRCELL TRANSPORT MEDIUM. Obtido de <http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/infecciosas/transport-medium-tm001.pdf>

Virotech Diagnostics (Ed.). (2016, Dezembro 20). Influenza A ELISA Influenza B ELISA IgG / IgM Testkit IgA Testkit.

Wahlgren, J. (2011). Influenza A viruses: an ecology review. *Infection Ecology & Epidemiology*, 1(1), 6004. <https://doi.org/10.3402/iee.v1i0.6004>

Watanabe, T., Watanabe, S., & Kawaoka, Y. (2010). Cellular Networks Involved in the Influenza Virus Life Cycle. *Cell Host & Microbe*, 7(6), 427–439. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2010.05.008>

WHO | World now at the start of 2009 influenza pandemic. (2009, Junho 11). Obtido 18 de Julho de 2017, de [http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1\\_pandemic\\_phase6\\_20090611/en/](http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/)

World Health Organization. (2008). Guidance on regulations for the transport of infectious substances 2009-2010 : applicable as from 1 January 2009. Obtido de <http://www.who.int/iris/handle/10665/69899>

World Health Organization. (2009a, Abril 28). CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A(H1N1).

World Health Organization. (2009b, Novembro). Clinical management of human infection with pandemic (H1N1) 2009: revised guidance. Obtido de [http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical\\_management\\_h1n1.pdf](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/clinical_management_h1n1.pdf)

World Health Organization (Ed.). (2010a). Use of Influenza Rapid Diagnostic Tests. Obtido de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44304/1/9789241599283\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44304/1/9789241599283_eng.pdf)

World Health Organization (Ed.). (2010b, Julho). Sex, gender and influenza. Obtido de [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44401/1/9789241500111\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44401/1/9789241500111_eng.pdf)

World Health Organization. (2014, Fevereiro). Influenza virus infections in humans. Obtido de [http://www.who.int/influenza/human\\_animal\\_interface/virology\\_laboratories\\_and\\_vaccines/influenza\\_virus\\_infections\\_humans\\_feb14.pdf](http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/virology_laboratories_and_vaccines/influenza_virus_infections_humans_feb14.pdf)

Zheng, W., & Tao, Y. J. (2013). Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. *FEBS Letters*, 587(8), 1206–1214. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.02.048>