



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES
RESPIRATÓRIAS AGUDAS CAUSADAS PELO VÍRUS
INFLUENZA EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO
HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN,
FORTALEZA - CE (2001 - 2004)**

MARLOS GOMES MARTINS

**FORTALEZA-CE
2005**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
MÉDICA

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES
RESPIRATÓRIAS AGUDAS CAUSADAS PELO VÍRUS
INFLUENZA EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO
HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN,
FORTALEZA – CE (2001 a 2004)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Orientadora: Profª. Drª Fernanda Edna Araújo Moura.

MARLOS GOMES MARTINS

FORTALEZA-CE
2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS
CAUSADAS PELO VÍRUS INFLUENZA EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO
HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN,
FORTALEZA – CE (2001 a 2004)**

MARLOS GOMES MARTINS

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, da Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Data da defesa 04/11/2006

BANCA EXAMINADORA

Dr. Fernando Couto Motta
Instituto Oswaldo Cruz

Dr. José Júlio da Costa Sidrim
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Dr. Álvaro Jorge Madeiro Leite
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

Dra. Fernanda Edna Araújo Moura (Orientadora)
Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará

À Deus, por me mostrar a luz nos momentos difíceis;

Aos meus pais Edson Sousa Martins e Maria Luciene Gomes Martins e minha irmã Luciane Gomes Martins, por serem meus alicerces e acreditarem em meus sonhos;

Aos meus familiares, pela torcida, carinho e o apoio em todos os momentos;

À Isadora Gomes Lima Santos (*in memorian*), porque você sempre estará em meu coração;

À minha namorada Maria Gardenny Ribeiro Pimenta, por sua paciência, amor, carinho e companheirismo em todos os momentos;

Aos meus amigos Cristianne Sousa Bezerra, Victor Emanuel Pessoa Martins e Maria Izabel Florindo Guedes, pelo apoio, pela amizade verdadeira e por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Fernanda Edna Araújo Moura, minha orientadora, pela sua paciência, ensinamentos e atenção dispensada ao longo desse trabalho.

Aos meus professores do mestrado, por todos os ensinamentos passados.

Aos meus colegas de curso, pelo companheirismo e incentivo durante esses meses.

A Ilha Fernanda da Silva Nunes, ex-aluna do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, pelo companheirismo e ter tido participação essencial neste trabalho.

À Marta Maria de Vasconcelos, secretária do curso, por sua dedicação e eficiência na resolução de etapas burocráticas.

Às estudantes de Medicina, Natássia Pinheiro Lavor, Ana Cláudia da S. Mendes e Virgínia de S. Furtado pelo auxílio dado durante o período experimental do trabalho.

À Prof^a Rosa Maria Salani Mota e Alexandre Galvão Patriota, do Laboratório de Estatística e Matemática Aplicada – Universidade Federal do Ceará (UFC), pela a ajuda na análise estatística dos dados.

Ao Laboratório de Vírus Respiratórios da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Rio de Janeiro, nas pessoas de Dr^a Marilda Mendonça Siqueira e Fernando Couto Motta, pelo aperfeiçoamento e concessão do espaço necessário para a realização da parte experimental deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes”.

Autor desconhecido

RESUMO

O vírus influenza é o único com a habilidade de causar epidemias anuais recorrentes em curto espaço de tempo, atingindo todas as faixas etárias, ocorrendo com maior gravidade em crianças e idosos. Este estudo teve como objetivo conhecer os aspectos demográficos e o padrão de sazonalidade das infecções respiratórias agudas (IRAs) causadas pelo vírus influenza em crianças atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin, na cidade de Fortaleza – Ceará, no período de janeiro de 2001 a julho de 2004. Foram coletadas 1950 amostras de aspirado de nasofaringe de crianças com sintomas de infecção respiratória aguda. Todas as amostras foram analisadas por reação de imunofluorescência indireta. A reação de cadeia da polimerase com transcrição reversa foi utilizada em 47 amostras positivas por imunofluorescência indireta dos anos de 2003 e 2004 para análise da variantes virais (H1 e H3) e influenza B. Um total de 156 amostras foram positivas para os vírus influenza A ou B, representando uma prevalência de 8%. Entre as infecções causadas por vírus, aquelas causadas pelos vírus influenza A e B representaram 24,1%. O vírus influenza apresentou um padrão de ocorrência anual regular, com surtos epidêmicos durante o primeiro semestre de cada ano, correlacionados aos períodos chuvosos. Os picos dos períodos epidêmicos de influenza antecederam ou ocorreram concomitantemente às campanhas nacionais de vacinação. Os vírus influenza A e B co-circularam em todos os anos de estudo, havendo uma predominância significativa do vírus influenza A (91%) em relação ao vírus influenza B (9%). Em relação ao setor de atendimento das crianças com infecções por vírus influenza observou-se a maioria delas foi atendida em ambulatórios (48,7%) e emergência (39,7%). Dezoito crianças infectadas pelo vírus influenza foram atendidas nas enfermarias (11,5%). Com relação à idade das crianças com influenza observou-se que essas infecções predominaram em crianças até dos dois anos de idade (55%). Infecções de vias aéreas inferiores predominaram em crianças até dois anos de idade. Cerca de 65,4% das infecções pelo vírus influenza foram diagnosticadas como infecções de vias aéreas superiores. Infecções de vias aéreas inferiores predominaram em crianças até dois anos de idade (68,5%). Nos anos de 2003 e 2004 foram identificadas as variantes virais A/H3 e B do vírus influenza, com predominância da primeira (78,7%).

Palavras-chaves: vírus influenza, sazonalidade, infecção respiratória aguda infantil.

ABSTRACT

The influenza virus is unique with its ability to cause recurring annual epidemics in a short time interval, affecting all ages, with larger gravity in children and elderly people. The aim of this study is to describe demographic features and the pattern of the seasonality of acute respiratory infections caused by influenza virus in children attended at Albert Sabin Children Hospital, in Fortaleza – Ceará, over the period of January period 2001 at July 2004. A total of 1950 samples of nasopharyngeal aspirates were collected from children with symptoms of acute respiratory infection. All samples were analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA). Forty seven Influenza A or B positive samples by IFA, in 2003 and 2004, were submitted to polymerase chain reaction with reverse transcription (RT-PCR) for analysis of viral variant H1 and H3 and influenza b. A total of 156 samples were influenza A or influenza B positive, representing a prevalence rate of 8%. Among the viral infections, those caused by influenza viruses represented 24,1%. The influenza virus showed a pattern of regular annual occurrence, observed during the first semester of each year, correlated to the rainy periods. The peak of the epidemic periods of influenza preceded or occurred concomitantly to the national campaigns of vaccination. Influenza virus A and B co-circulated in all years of the study, with a significant predominance of the virus influenza A (91%) over influenza B (9%). Regarding to the medical care setting, the majority of the children with influenza infection were attended in ambulatories (48,7%) and emergency (39.7%). Eighteen children with influenza were attended in wards (11,5%). Regarding to the age of the children with influenza these infections predominated in children until two years of age. About 65,4% of the influenza infections were diagnosed as upper respiratory tract infections. Lower respiratory tract infection predominated in children until two years of age. In 2003 and 2004 were identified the variants A/H3 and B, with predominance of the first (78,7%).

Keywords: Influenza virus, seasonality, acute children respiratory infection.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS | 12 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 14 |
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Infecções respiratórias agudas | 15 |
| 1.2 Vírus Influenza | 15 |
| 1.2.1 Histórico | 15 |
| 1.2.2 Caracterização viral | 16 |
| 1.2.2.1 Replicação viral | 18 |
| 1.2.2.2 Variação antigênica | 19 |
| 1.2.3 Classificação e nomenclatura | 20 |
| 1.2.4 Transmissão | 20 |
| 1.2.5 Epidemiologia | 20 |
| 1.2.5.1 Idade | 20 |
| 1.2.5.2 Condições sócio-econômicas | 21 |
| 1.2.5.3 Sazonalidade | 21 |
| 1.2.5.4 Reservatórios animais | 21 |
| 1.2.6 Vigilância epidemiológica | 21 |
| 1.2.6.1 Vigilância Global | 21 |
| 1.2.6.2 Vigilância no Brasil | 22 |
| 1.2.7 Manifestações clínicas | 23 |
| 1.2.8 Patogenia e resposta imune | 24 |
| 1.2.9 Profilaxia e tratamento | 25 |
| 1.2.10 Diagnóstico laboratorial | 27 |
| 1.3 Importância do estudo | 28 |
| 2. OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 Objetivo geral | 29 |
| 2.2 Objetivos específicos | 29 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 30 |
| 3.1 Descrição de estudo | 30 |
| 3.1.1 Tipo de estudo | 30 |
| 3.1.2 Local de estudo | 30 |
| 3.1.3 Critérios de inclusão | 30 |
| 3.2 Coleta de dados | 30 |

| | |
|---|----|
| 3.2.1 Coleta de Material | 30 |
| 3.2.2 Entrevista e Preenchimento da Ficha Epidemiológica | 31 |
| 3.3 Questões Éticas | 31 |
| 3.4 Processamento do Material Clínico | 32 |
| 3.5 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) | 32 |
| 3.6 Tipagem e subtipagem gênica da hemaglutinina viral | 33 |
| 3.6.1 Extração do RNA Viral | 33 |
| 3.6.2 Transcrição Reversa (RT) | 34 |
| 3.6.3 PCR | 34 |
| 3.6.4 Visualização dos Produtos Amplificados | 35 |
| 3.7 Análise Estatística dos Dados | 36 |
| 4. RESULTADOS | 37 |
| 4.1 Prevalência das IRAs e infecções pelo vírus influenza | 37 |
| 4.2 Sazonalidade | 38 |
| 4.3 Caracterização da população de estudo | 40 |
| 4.4 Vacinação | 43 |
| 4.5 Resultados das técnicas | 43 |
| 4.5.1 RIFI | 43 |
| 4.5.2 RT-PCR | 43 |
| 5. DISCUSSÃO | 46 |
| 5.1 Prevalência do vírus influenza | 46 |
| 5.2 Vigilância Epidemiológica | 49 |
| 5.3 Tipos e subtipos | 49 |
| 5.4 Co-infecção viral | 52 |
| 5.5 Sazonalidade | 52 |
| 5.6 Características da população | 55 |
| 5.7 Vacinação | 58 |
| 5.8 Técnicas de diagnóstico | 59 |
| 5.9 Considerações finais | 60 |
| 6. CONCLUSÕES | 62 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 63 |
| APÊNDICE A - Soluções e reagentes | 78 |
| APÊNDICE B - Resultados da RT PCR (2003-2004) | 81 |
| ANEXO A - Termo de consentimento livre esclarecido | 82 |
| ANEXO B - Ficha epidemiológica | 83 |

| | |
|--|----|
| ANEXO C - Esquemas de lâminas de imunofluorescência | 85 |
| ANEXO D - Processamento das amostras | 86 |
| ANEXO E - Reação de imunofluorescência indireta | 87 |
| ANEXO F - Extração de RNA | 88 |
| ANEXO G - RT-PCR | 89 |

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| FIGURA 1 - | Representação esquemática do vírus influenza. | 18 |
| FIGURA 2 - | Equipamento de aspiração de secreção da nasofaringe. | 31 |
| FIGURA 3 - | Células positivas para vírus influenza por RIFI. | 33 |
| FIGURA 4 - | Gel fotografado exibindo a diferença entre os três produtos de PCR para os vírus influenza A H1 e H3 e o vírus influenza B. | 36 |
| FIGURA 5 - | Distribuição anual dos casos de infecção respiratória aguda e infecção pelo vírus influenza. | 37 |
| FIGURA 6 - | Distribuição mensal dos casos de infecção respiratória aguda, casos de infecção por vírus respiratórios e infecção pelo vírus influenza. | 38 |
| FIGURA 7 - | Correlação entre os casos de infecção pelo vírus influenza e a pluviometria. | 39 |
| FIGURA 8 - | Distribuição mensal dos tipos virais A e B do vírus influenza durante os quatro anos de estudo. | 39 |
| FIGURA 9 - | Distribuição mensal de casos de infecção pelo vírus influenza e dos períodos das campanhas de vacinação contra a gripe nos quatro anos do estudo. | 43 |
| FIGURA 10- | Resultados da técnica de PCR em amostras positivas por RIFI dos anos 2003 (A) e 2004 (B). | 45 |
| QUADRO 1 - | Descrição dos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR | 35 |
| TABELA 1 - | Prevalência dos vírus influenza A e B durante os quatro anos do estudo. | 38 |
| TABELA 2 - | Caracterização geral da população do estudo | 40 |
| TABELA 3 - | Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o sexo e a idade. | 41 |
| TABELA 4 - | Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o setor de coleta das amostras e a idade. | 42 |
| TABELA 5 - | Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o diagnóstico clínico e a idade. | 42 |
| TABELA 6 - | Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o diagnóstico clínico e o setor de coleta das amostras. | 42 |
| TABELA 7 - | Concordância entre os resultados obtidos pela RIFI e RT-PCR. | 44 |

TABELA 8 - Distribuição da ocorrência dos tipos e subtipos virais do vírus influenza 44 durante os anos de 2003 e 2004.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|---|
| a.C | Antes de Cristo |
| Ac Neu | Ácido Neuramínico |
| AIDS | Síndrome da imunodeficiência adquirida |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| EDTA | Etilenodiaminotetracético |
| HA | Hemaglutinina |
| HE | Hemaglutinina esterase |
| HIAS | Hospital Infantil Albert Sabin |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IRAs | Infecções respiratórias agudas |
| IVAI | Infecção das vias aéreas inferiores |
| IVAS | Infecção das vias aéreas superiores |
| MDCK | Madin-Darby Canine Kidney |
| MEM-E | Meio essencial mínimo com sais de Earle |
| NA | Neuraminidase |
| NEP | Proteína de exportação nuclear |
| NP | Nucleoproteína |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| pb | Par de base |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PBS | Tampão salina-fosfato |
| PMK | Primary Rhesus Monkey |
| qsp | Quantidade suficiente para |
| RIFI | Reação de Imunofluorescência Indireta |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| RNP | Ribonucleoproteína |
| RT | Transcrição reversa |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| SNF | Secreção nasofaríngea |
| VSR | Vírus sincicial respiratório |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Infecções respiratórias agudas

As infecções das vias aéreas, fúngicas, bacterianas e virais, são as que mais freqüentemente comprometem o ser humano (FARHAT et al, 2002) sendo responsável por mais de 25% de todo o atendimento médico domiciliar e ambulatorial no mundo (COUCEIRO, 2002) e são as principais responsáveis pelas internações na infância. Os vírus respiratórios têm ganhado destaque após o declínio de casos por infecção bacteriana devido aos avanços farmacológicos e, ainda, a melhoria das técnicas de diagnóstico viral revelou prevalências antes subestimadas (KIM et al, 2000), estando relacionadas com 90-95 % das infecções respiratórias (COUCEIRO, 2002). Eles são causadores de representativa morbidade e mortalidade na infância e na velhice.

Nas regiões temperadas existe uma clara variação sazonal, com picos durante os meses de inverno. Esta variação é menor nos trópicos, onde ocorre baixa flutuação da temperatura ambiental. No entanto, estas infecções estão associadas aos períodos de maior umidade e chuvosos (SHEK & LEE, 2003).

Os rinovírus, coronavírus, adenovírus, enterovírus, vírus sincicial respiratório (VSR), vírus influenza e parainfluenza são os principais causadores de infecções respiratórias na atualidade (MACKIE, 2003). O vírus influenza ganhou destaque a partir da grande pandemia de 1918, sendo preocupação constante da Organização mundial de Saúde (OMS).

1.2 Vírus Influenza

1.2.1 Histórico

O vírus influenza é o agente etiológico da gripe, uma infecção respiratória aguda (IRA) altamente contagiosa. O nome “influenza” é a forma italiana do latim *influenzia*, que se utilizou no século XV para designar epidemias atribuídas à influência das estrelas, planetas e poderes ocultos. Os ingleses usaram o termo a partir do século XVII, enquanto os franceses atribuíram o termo *grippe*, do qual deriva o nome em português (MURPHY & WEBSTER, 1996).

A gravidade das pandemias e epidemias de influenza ocorridas no passado fez do vírus influenza o mais estudado, antes da emergência do vírus da imunodeficiência humana (AIDS). A gripe tem dizimado populações em todo o planeta desde tempos antigos. Em 412 antes de Cristo (a.C.), Hipócrates escreveu sobre esta ocorrência. Em Atenas, nos anos de 430 a 427 a.C., foi descrita por Tucídides, a ocorrência de uma praga que poderia ter sido de influenza (HAYDEN & PALESE, 1997). Historiadores da medicina acreditam que 12

pandemias já ocorreram nestes últimos 400 anos e que 11 delas teriam iniciado na China (KUSZEWSKY & BRYDAK, 2000; POTTER, 1998).

A primeira epidemia realmente bem documentada ocorreu em 1889, iniciada na Rússia central, e se espalhou por toda a Europa atingindo a América no início de 1890. Em meados daquele ano, a doença atingiu todos os cantos da Terra caracterizando uma pandemia. Cerca de 300 mil a 1,5 milhões de pessoas morreram em todo o mundo, vítimas de pneumonia em sua grande maioria (POTTER, 1998). Em 1891, após investigações, Pfeiffer em seu intuito de isolar o microrganismo responsável pela gripe, isola uma bactéria e a denomina *Bacillus influenzae*, determinando esta como agente etiológico da gripe. Esta bactéria já havia sido encontrada por O. Bujwid em uma biópsia no ano anterior. De fato, o vírus influenza só foi relacionado como causador da gripe em 1933 por Wilson Smith, Christopher Andrewes e Patrick Laidlow do Instituto Nacional para Pesquisas Médicas em Londres (KUSZEWSKY & BRYDAK, 2000), apesar de já haver sido isolado em uma praga entre as galinhas em 1901 (GLEZEN & COUCH, 1989).

No século passado, ocorreram três grandes pandemias. Em decorrência da primeira guerra mundial, ocorreu a gripe “espanhola” em 1918 infectando metade da população mundial causando cerca de 40 milhões de mortes em todo o mundo (OXFORD et al, 2002). Foi considerada uma pandemia de virulência sem precedentes (KITLER et al, 2002). Esta foi seguida pela gripe “asiática”, em 1957, e depois a gripe de “Hong Kong”, em 1968. Em 1977, ocorreu a re-emergência viral causando a epidemia mundial “russa”.

O vírus influenza apresenta uma alta prevalência no sul da China. Há evidências da origem chinesa do vírus que causaram as pandemias de 1957, 1968 e 1977. Os recentes surtos em Hong Kong pela gripe aviária mostram a importância da vigilância virológica nas regiões de grande potencial pandêmico (NICHOLSON et al, 2003).

1.2.2 Caracterização viral

O vírus Influenza pertence à família *Orthomyxoviridae* e compreende quatro gêneros: *Influenzavirus A, B, C* e *Thogotovirus* (VAN REGENMORTEL, 2000). Os vírus Influenza do tipo A possuem vários subtipos que são distinguidos por características antigênicas de suas glicoproteínas de superfície: a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) (JONG et al, 2000). Existem 16 tipos de HA (H1 a H16) e 9 de NA (N1 a N9) até então identificadas. Todos os subtipos foram isolados de aves aquáticas onde eles se replicam, principalmente, no trato digestivo de forma assintomática (BEBY-DEFAUX et al, 2003). Nos homens são em geral encontrados somente alguns subtipos virais de vírus Influenza A, possuindo estes uma HA dos tipos H1, H2 ou H3 e uma das NA dos tipos N1 ou N2 (SIMONSEN, 2001). Estes

subtipos também foram isolados em porcos, cavalos e até mesmo em baleias (MANUGUERRA, 2001). O vírion tem um diâmetro médio de 100 nm, apresenta um nucleocapsídeo de simetria helicoidal e um envelope lipoprotéico que pode assumir uma forma esférica, ovalada ou alongada (BEBY-DEFAUX et al, 2003).

O genoma viral é formado de ácido ribonucléico (RNA) monocatenário, de polaridade negativa e segmentado (JONG et al, 2000). Os vírus Influenza dos tipos A e B possuem oito segmentos, enquanto os do tipo C possuem sete. Os segmentos de RNA codificam de oito a dez polipeptídios, em sua maior parte são de proteínas estruturais. Cada segmento de RNA está associado a um complexo de transcrição e replicação constituída pelas proteínas PB1, PB2 e PA (ou P3 para os vírus do tipo C), ainda há a nucleoproteína (NP) que assegura a coesão na formação da ribonucleoproteína (RNP) (COUCEIRO, 2002).

O envelope consiste em uma dupla camada fosfolipídica, originária da célula hospedeira, estando associado pela camada interna à proteína M1 que lhe confere rigidez. O envelope apresenta a proteína transmembranar M2 para os vírus tipo A, NB para o tipo B e CM2 para o tipo C, todas apresentando um papel de bomba de prótons. A proteína de exportação nuclear (NEP) (antigamente denominada NS2) está associada à proteína M1, mediando a exportação das RNPs para o núcleo da célula no curso da infecção. A proteína NS1, presente somente em células infectadas, inibe a ativação de proteínas ativadas por interferon e regula a expressão de mensageiros celulares e virais por diversos mecanismos (HAYDEN & PALESE, 1997).

Por fim, as glicoproteínas transmembranares HA e NA formam espículas que se projetam para fora da partícula viral em número de 400 a 500 e são encontradas somente nos vírus dos tipos A e B (JONG et al, 2000). Estas estruturas possuem os principais epítópos para anticorpos neutralizantes. A HA é composta por três cadeias polipeptídicas unidas de maneira não-covalente. A infecciosidade viral se manifesta após a clivagem do precursor HA0 em duas subunidades HA1 e HA2. A glicoproteína HA tem função de reconhecer e se ligar ao receptor de natureza siática na superfície da célula infectada (HA1), permitindo assim a fusão do envelope do vírus com a da célula (HA2). A NA dos vírus dos tipos A e B possuem a estrutura tetramérica. A NA promove a clivagem da ligação HA-ácido siálico a fim de promover a liberação dos vírus recém formados e permitir sua disseminação. Nos vírus do tipo C existe apenas um tipo de espícula, a hemaglutinina esterase (HEF) que executa as duas funções. A proteína HE0 é clivada em HE1 e HE2 para ser ativada (BEBY-DEFAUX et al, 2003). O modelo do vírus tipo A pode ser visto na Figura 1.

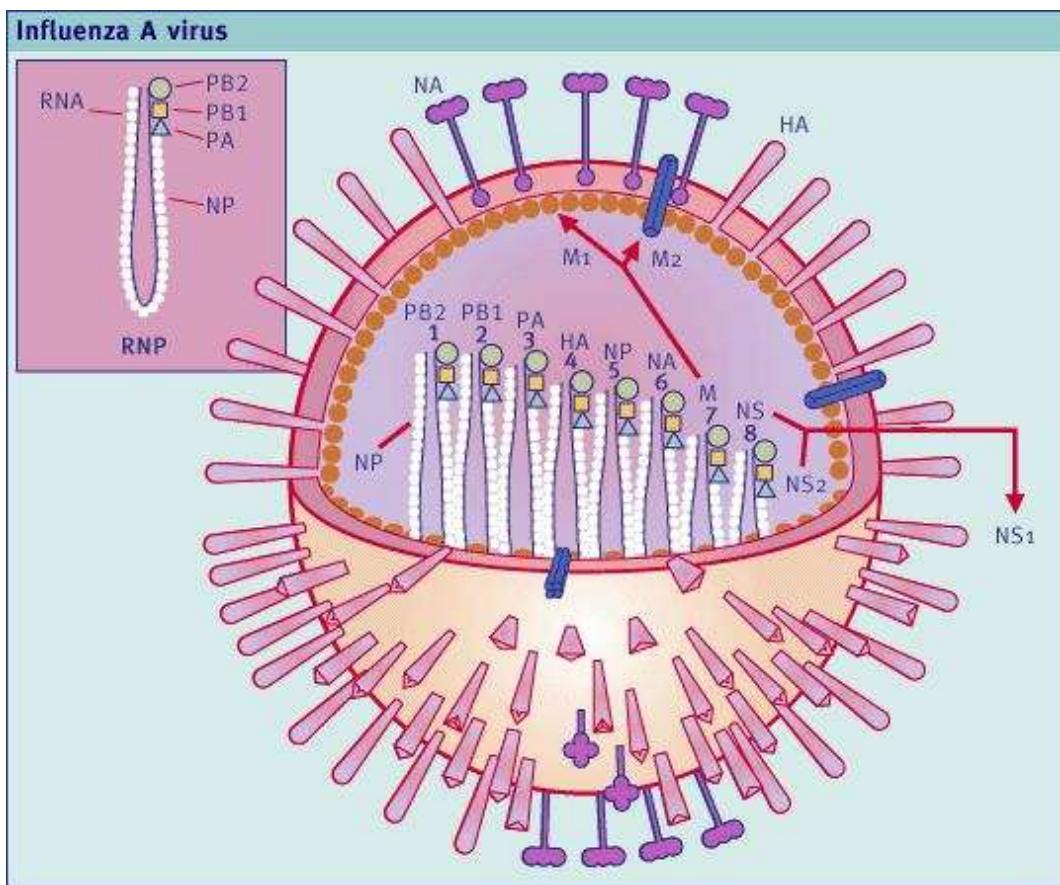


FIGURA 1 – Representação esquemática do vírus influenza.

Fonte <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/img0002.jpg>

1.2.2.1 Replicação viral

O processo de replicação, pode-se dividir em várias etapas. A primeira etapa corresponde à adsorção do vírus a superfície celular. A hemaglutinina (HA1) entra em contato com receptores celulares específicos constituídos de glicoproteínas contendo ácido siálico ou ácido N-acetil neuramínico (Ac Neu). Existe uma diferença de afinidade das HA dos vírus em função dos tipos de ligação glicosídicas entre o Ac Neu e a galactose. Assim, para os vírus aviários ou eqüinos e os vírus humanos existe, respectivamente, uma afinidade pelas ligações do tipo Ac Neu α 2,3 Gal e Ac Neu α 2,6 Gal (ITO et al, 1998). Para o vírus do tipo C, a adsorção ocorre pela interação da HE e os ácidos 9-O-N acetilneuramínicos (BEBY-DEFAUX et al, 2003).

A etapa seguinte é a internalização do vírus na célula por endocitose. Como o vírus do tipo A é o mais estudado e o mais bem conhecido, será utilizado como modelo para descrição desta etapa (VAN der WERF, 2001; YEWDELL & GARCIA-SASTRE, 2002; ZAMBON, 2001). A diminuição do pH no interior do endossoma promove a fusão do envelope viral com a membrana do endossoma mediada pela proteína HA2. Com a ativação da proteína M2, uma variedade de canal iônico, permite a dissociação da proteína M1 dos RNPs. Em seguida, os

segmentos de RNA viral são encaminhados para o núcleo para serem transcritos com a ajuda do complexo PB1-PB2-PA. Para efetuar a transcrição, o vírus seqüestra um pequeno fragmento de RNA da célula que deve iniciar a transcrição. Os segmentos complementares terão dois destinos: alguns se comportarão como RNA mensageiros e serão traduzidos em proteínas e outros serão transcritos em RNA complementares que constituirão o genoma viral dos vírus neoformados. Nesta etapa da multiplicação viral, a proteína NEP promove a transferência dos RNPs neoformados do núcleo para o citoplasma onde são mantidos pela proteína M1. Na fase final da multiplicação viral ocorre a união entre os RNPs com o envelope viral e a saída do vírus por brotamento. As glicoproteínas virais de superfície se inserem na membrana plasmática e os nucleocapsídeos se alinham sob a membrana onde ocorrerá o brotamento. A NA desfaz as ligações dos ácidos siálicos da HA e promove a liberação do vírion no meio extracelular (BEBY-DEFAUX et al, 2003; COUCEIRO, 2002).

1.2.2.2 Variação antigênica

A gripe pode se apresentar de três formas: esporádicas, epidêmicas e pandêmicas (RICHARD et al, 2000). Estas variações do surto estão relacionadas com as formas da variação genética do vírus que podem ser pequenas (desvios) ou grandes (deslocamentos) (JONG et al, 2000; (a) LIN et al, 2004). Os desvios são responsáveis por epidemias de extensão e intensidade variável a cada ano e os deslocamentos são responsáveis pelas pandemias. As pequenas variações antigênicas resultam, principalmente, da acumulação de mutações pontuais nos genes da HA e NA (COX et al, 2003; LAVER & GARMAN, 2001; NICHOLSON et al, 2003), tais erros promovem alterações nos domínios antigênicos das proteínas. Os anticorpos neutralizantes exercem pressão seletiva até o momento em que ocorre a emergência de uma nova variante viral. Esta cepa pode levar a ocorrência de uma epidemia que, geralmente, ocorrem em intervalos de 2 a 3 anos para o vírus influenza do tipo A e de 4 a 5 anos para o tipo B (NICHOLSON et al., 2003). Os deslocamentos ocorrem apenas com o tipo viral A. Quanto dois subtipos virais infectam o mesmo hospedeiro pode ocorrer a permuta dos segmentos de RNA e assim gerar um subtipo totalmente novo. Este evento ocorre nas aves, nos porcos e no próprio homem (AYMARD et al, 1999; BUONAGURIO et al, 1985; FITCH et at, 1997; HILLEMAN, 2002; MANUGUERRA, 2002). Assim, o novo vírus surge com uma HA e/ou NA incomuns ao sistema imunológico das populações humanas. Estes são responsáveis pelas epidemias mundiais ou pandemias e surgem em períodos irregulares a razão de três a quatro por século (BEBY-DEFAUX et al, 2003).

1.2.3 Classificação e nomenclatura

A nomenclatura das cepas do vírus influenza é feita segundo regras internacionais estabelecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), ela é feita a partir de diferentes informações separadas por barra: o tipo do vírus/o hospedeiro de origem, quando este não for humano/local do isolamento/o número da cepa/e o ano do isolamento seguido da caracterização antigênica da HA e da NA no caso de influenza do tipo A (BEBY-DEFAUX et al, 2003; FORLEO-NETO et al, 2003).

Ex: A/Brasil/2/78 (H3N2)

1.2.4 Transmissão

O vírus influenza causa uma rápida infecção e é de fácil transmissão, não existem barreiras geográficas que impeçam a ocorrências de extensas epidemias (CHAKRAVERTY et al, 1986). A transmissão pessoa a pessoa é feita através da inalação de aerossóis de secreção nasal (BEBY-DEFAUX et al., 2003; HAYDEN & PALESE, 1997). A taxa de disseminação torna-se maior em comunidades fechadas. Os vírus são viáveis por 24 horas após a aerosolização em condições de baixa umidade relativa do ar (17-24%), mas perde a infectividade dentro de uma hora em alta umidade. Os vírus podem manter a atividade após dois dias em superfície não-porosa. A disseminação via fômites ainda não está clara, mas, além da transmissão pelos próprios funcionários, pode estar envolvida nos surtos de influenza nosocomiais, (JACOMO et al., 2001; HAYDEN & PALESE, 1997). Tais características mostram a grande capacidade disseminatória do vírus influenza.

1.2.5 Epidemiologia

1.2.5.1 Idade

O vírus influenza causam infecções graves em todas as faixas etárias e estão freqüentemente associadas a uma mortalidade expressiva entre os idosos (HAYDEN & PALESE, 1997; NICHOLSON et al, 2003). As crianças tendem a desenvolver complicações sérias e têm um papel importante na introdução e disseminação dos vírus na comunidade (GLEZEN, 2000). Casos entre crianças na idade escolar geralmente têm um pico no início do período epidêmico, seguidos por infecções entre crianças de baixa idade e adultos. Existem também evidências de que a soroconversão continua a ocorrer mesmo no período interepidêmico, sugerindo persistência viral ao longo do ano (MUNOZ, 2003).

1.2.5.2 Condições sócio-econômicas

A morbi-mortalidade torna-se elevada entre as crianças mal-nutridas e em locais de pouco acesso à unidade de saúde (NICHOLSON et al, 2003, MUÑOZ, 2003). Em condições precárias, o risco da infecção se agravar é elevado em até seis vezes (MUÑOZ, 2003).

1.2.5.3 Sazonalidade

Nas regiões temperadas do globo, as epidemias de gripe, ocorrem ao longo do inverno por seis a oito semanas com intensidade variável a cada ano, com data de início incerta (BEBY-DEFAUX et al, 2003). Nas regiões intertropicais, o vírus pode ocorrer de forma aleatória ao longo do ano, muitas vezes ocorrendo durante o período de alta pluviometria ou mesmo não apresentando uma sazonalidade distinta, ocorrendo ao longo de todo o ano. Nestas regiões a morbidade e a mortalidade são provavelmente muito subestimadas (BEBY-DEFAUX et al, 2003; NICHOLSON et al, 2003).

1.2.5.4 Reservatórios animais

Os principais reservatórios do vírus do tipo A são as aves aquáticas migratórias, que albergam todos os tipos de subtipos virais. Estes eventualmente são transmitidos a aves domésticas (LIU et al, 2003) e mamíferos (OLSEN, 2002; WEBBY et al, 2001; WEBBY et al, 2002), dentre estes o homem. Os vírus se replicam no intestino das aves de forma assintomática e são eliminados nas fezes em grandes quantidades. Graças à migração, os vírus se propagam por grandes extensões e são capazes de contaminar animais domésticos (WEBSTER, 1998). Nos humanos, as crianças são consideradas o principal reservatório, sendo responsáveis pela disseminação do vírus durante a época de surto (GLEZEN, 2000).

1.2.6 Vigilância epidemiológica

1.2.6.1 Vigilância Global

As infecções causadas pelo vírus influenza já somam milhões de casos de ocorrência em todo o mundo, tendo ocorrido milhares de mortes, numerosas complicações e bilhões de dólares gastos. A OMS coordena uma rede mundial de vigilância de influenza, cujo objetivo é detectar e prevenir surtos de gripe, que ocorrem pela circulação de cepas dos vírus em uma população sem imunidade prévia (AULT, 2004; KITLER et al., 2002; LAYNE et al., 2001; WEBBY & WEBSTER, 2003). A idéia surgiu em 1947 e hoje mobiliza uma rede de 110 laboratórios nacionais em 80 países, coordenados pelos seguintes centros de referência que se encontram vinculados a OMS: Instituto de Pesquisas Médicas do Reino Unido, na Inglaterra,

Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, O CSL Limited, na Austrália e o Instituto de Doenças Infecciosas, no Japão.

Em 2001, a OMS iniciou o desenvolvimento de uma Agenda Global para Vigilância e Controle do Vírus Influenza. Ela está amparada por quatro objetivos principais: vigilância do vírus influenza, estudos que aumentem o conhecimento sobre a doença, ampliar o uso da vacina e acelerar os preparos contra-pandemia. Em maio de 2002, o documento foi adotado após debate e exposição ao público. O documento tem por ementas, o estímulo ao desenvolvimento de métodos de rápida detecção de todos os subtipos virais, desta forma será possível integrar a vigilância em humanos e em outros animais (WEBBY & WEBSTER, 2003).

Estudiosos do assunto aceitam que uma nova pandemia é inevitável e pode ser iminente. O maior desafio para o controle do vírus influenza seria determinar a magnitude dos reservatórios animais. É impossível determinar todo o espectro de subtipos virais que hoje são encontrados circulando entre os animais, mas podem ser priorizados alguns subtipos para a vacina pandêmica. Preliminares mostram que os subtipos H2, H5, H6, H7 e H9 são mais facilmente transmitidos para humanos. Os subtipos do vírus influenza A, H1 e H3, continuam circulando na população e sofrendo modificações pontuais no genoma que permitem a evasão à imunidade prévia da população e causando surtos anualmente. Embora as mutações possam aumentar a virulência, o que se tem constatado é que os dois subtipos virais mais dominantes, H1N1 e H3N2, têm causado infecções cada vez mais atenuadas (WEBBY & WEBSTER, 2003). Em contrapartida outros subtipos, agora silenciados, podem retornar e infectar uma população que não possui imunidade para isto, como é o caso do H5N1, causador da influenza aviária, que desde 1997, ano de sua emergência, apresentou um alto índice de mortalidade (CLAAS et al, 1998; YUEN et al, 1998). Outros subtipos estão também sendo pesquisados, como os subtipos H1N2, H7N7 e o H9N2, também detectados em humanos e animais, como casos endêmicos (CHEN et al, 2001; GREGORY et al, 2001; WEBSTER et al, 1981).

1.2.6.2 Vigilância no Brasil

No Brasil existem três grandes institutos que se integram a esta rede: o Instituto Oswaldo Cruz, no estado do Rio de Janeiro, o Instituto Evandro Chagas, no estado do Pará e o Instituto Adolfo Lutz, no estado de São Paulo. O primeiro é considerado laboratório de referência nacional, enquanto os outros dois de referência regional. A rede foi ampliada com a adesão de LACENs de vários estados. Mesmo assim, vigilância da influenza no Brasil apresenta ainda alguns obstáculos, como abrangência ainda limitada das unidades sentinelas; a infra-estrutura deficiente da rede de laboratórios, principalmente no que diz respeito à

caracterização completa dos vírus identificados; a validação dos indicadores epidemiológicos; o aperfeiçoamento dos mecanismos de gerenciamento de dados e a produção e disseminação de informação sobre a gripe que hoje ainda é muito restrita (SVS, 2004). Estes laboratórios integram a Rede Nacional de Vigilância da Influenza, parte do Ministério da Saúde, e visam a identificação de cepas nas regiões sul, sudeste, centro-oeste e norte do Brasil (PAIVA et al, 2003). Existem diversos estudos já feitos que mostram características diferentes de acordo com o local de estudo, mas, em geral, são feitos de forma aleatória e descontínua (DONALISIO et al 2003; MARTINS et al, 2002; MOTTA et al, 2000; MOURA et al, 2003; PAIVA et al, 2001 PAIVA et al, 2003; SANTOS et al, 1997; STRALIOTTO et al, 2002).

O Ceará foi integrado a rede nacional de vigilância de influenza no ano de 2004, através da inclusão de unidades sentinelas e do Laboratório Central (LACEN) em Fortaleza. Três anos antes, em 2001, foram iniciados os trabalhos pesquisa sobre viroses respiratórias no Laboratório de Virologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará em parceria com o Hospital Infantil Albert Sabin da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará, de onde procede a população de estudo.

1.2.7 Manifestações clínicas

A gripe é uma doença que possui um curto período de incubação podendo levar de um a dois dias (KUSZEWSKI & BRYDAK, 2000), tendo um período agudo que pode durar até sete dias. A sintomatologia clássica é comum a várias outras infecções respiratórias: febre, dor de garganta, cefaléia, mialgia, prostração, mal estar geral, tosse e coriza (ZAMBON et al, 2001). Problemas pulmonares, de coração, cérebro, fígado, rins e músculos também podem ocorrer. A doença é fulminante geralmente quando ocorre a infecção primária por uma cepa de alta virulência seguido por infecção bacteriana secundária (NICHOLSON et al, 2003).

Entre as crianças os sinais clínicos são semelhantes aos encontrados em outras doenças respiratórias e não-respiratórias (SANNI et al, 2004). Além das manifestações clínicas mais comuns ocorre também irritabilidade, anorexia, vômito, diarréia, dor abdominal, letargia, dificuldade respiratória, dispnéia e apnêia. A febre pode apresentar uma temperatura superior a 40°C e casos de otite também estão presentes em crianças menores de três anos. Em crianças menores de cinco anos é comum encontrar tosse, rinite e febre, e em crianças com poucos meses é mais freqüente apresentar apenas uma febre muito alta com ausência de qualquer outro sintoma. Em neonatos é maior a ocorrência de internação (MUNOZ, 2003).

Podem ocorrer complicações que incluem pneumonia viral ou por infecção secundária bacteriana, bronquiolite, laringotraqueobronquite e a otite média. Complicações fora do trato respiratório incluem a miosite, miocardite e comprometimento do sistema nervoso central que

envolve a encefalite, ataques febris e síndrome de Reye. A persistência de febre e tosse são indicativos de complicações do quadro (SANNI et al, 2004).

1.2.8 Patogenia e resposta imune

Os distúrbios respiratórios virais são os mais freqüentes e que apresentam maior dificuldade de prevenção de todas as doenças infecciosas, variando em intensidade desde um resfriado comum, desconfortável, mas autolimitado, à pneumonias de alto potencial de letalidade (GUTIERREZ et al, 2001; HAK et al 2003). Ademais, as infecções virais danificam o epitélio brônquico e obstruem as vias aéreas, levando assim a uma infecção secundária por bactérias, como o *S. pneumoniae*, *Staphylococcus sp.* e *Haemophilus sp.* (CONNOLY et al, 1993; SOCAN, 1999; SAMUELSON, 2000). O vírus influenza é causador de infecções respiratórias altas (rinite, sinusite, otite média, faringite e amigdalite) e baixas (laringotraqueobronquite, bronquiolite, pneumonia intersticial e pleurite), incluindo também o comprometimento cardíaco (BELSHE et al, 1998; NAGHAVI et al, 2000; NICHOL et al, 1994).

Embora o sítio de replicação inicial seja o epitélio ciliado traqueobronquial, todo o trato respiratório pode ser envolvido. O vírus pode ser detectado nas secreções 24 horas após o início da doença. Os títulos virais são altos nas secreções nasofaríngeas por até 72 horas e depois declina até o quinto dia. Em crianças de baixa idade, os títulos virais são altos por um longo período, sendo possível detectar o vírus algumas semanas após o início da sintomatologia (NICHOLSON et al, 2003).

Histologicamente, a infecção pelo vírus influenza resulta numa resposta celular inflamatória da mucosa, que consiste principalmente em monócitos, linfócitos e alguns neutrófilos. Verifica-se a presença de edema da submucosa. O tecido pulmonar pode revelar doença da membrana hialina, enfisema alveolar e necrose das paredes alveolares (MURRAY et al, 2000). A mucosa tumefacta e o exsudato viscoso podem obstruir os canais nasais, seios paranasais ou tubas de Eustáquio e acarretar uma infecção bacteriana secundária supurativa. A amigdalite induzida pelo vírus é freqüente em crianças, embora não esteja relacionada à formação de abscessos e supuração como ocorre em infecções estafilocócicas e estreptocócicas.

Na infecção do trato respiratório inferior, como a laringotraqueobronquite e a bronquiolite, há uma abundante produção de exsudato bem como a tumefação das cordas vocais. O comprometimento da função mucociliar estabelece uma porta de entrada para infecções bacterianas secundárias que podem levar ao quadro de pneumonia (SAMUELSON, 2000).

A recuperação está relacionada à produção de interferon e às respostas imunológicas celulares. As respostas das células T são importantes para a recuperação e imunopatogenia. Entretanto, a infecção pelo vírus da influenza deprime a função dos macrófagos e das células T, dificultando a resolução imune (MURRAY et al, 2000). A recuperação freqüentemente precede a detecção de anticorpos no soro ou nas secreções.

A proteção contra a reinfecção está primariamente associada ao desenvolvimento de anticorpos anti-HA, porém anticorpos contra a NA também tem caráter protetor. A resposta humoral é específica para cada cepa de vírus da influenza, porém a resposta imune celular é menos específica podendo responder a cepas diferentes do mesmo tipo viral (NASH, 1999). Os principais alvos antigênicos são as proteínas NP, PB2, M1 e HA (BEBY-DEFAUX et al, 2003). Os sintomas clássicos e a evolução da doença são determinados pelas respostas do interferon e das células T e pela extensão da perda de tecido epitelial. O reparo do tecido comprometido é iniciado dentro de 3 a 5 dias após o aparecimento dos sintomas, mas pode exigir um mês. (MURRAY et al, 2000; ABBAS et al, 2000).

Estudos sobre a alta patogenicidade do vírus influenza derivam de estudos com vírus influenza aviário. Tais investigações são potencialmente relevantes para a doença humana porque alguns mecanismos de patogenicidade em aves podem ocorrer em mamíferos, além disso, as novas cepas de influenza tem tido origem em reservatórios aviários. O tropismo por tecidos e a capacidade de disseminação sistêmica são os mais importantes determinantes na patogenicidade em aves. A correlação molecular das propriedades patogênicas reside no sítio de clivagem da HA. No entanto, em mamíferos, outros fatores também são determinantes de patogenicidade com a proteína NS1, PB2 e NA.

Estudos genômicos em material humano preservado da pandemia de 1918 constataram que a alta patogenicidade do vírus não tinha correlação molecular da HA com a virulência em cepas aviárias. Estudos promoveram ensaios de recombinação no gene codificador da HA, o que modificava a estrutura final da proteína e constataram, em camundongos, que ocorria um aumento substancial na virulência, porém esta alteração não é suficiente para explicar a sua patogenicidade (NICHOLSON et al, 2003).

1.2.9 Profilaxia e tratamento

A imunização anual com vacinas contra influenza tem sido a principal medida profilática da gripe e redução da morbidade e mortalidade relacionada à doença. Atualmente são distribuídas entre 180 a 200 milhões de doses de vacina no mundo (FORLEO-NETO et al, 2003). O contínuo impacto que o vírus ainda possui na população motiva o contínuo desenvolvimento de estratégias para a prevenção e controle. A vacina inativada de

administração parenteral tem sido usada desde os anos 40, ela é composta pelas cepas vírais mais recentes produzindo anticorpos protetores em até 90% dos casos, e em idosos (acima de 65 anos) a proteção chega a 80%. A vacina hoje é subtilizada, pois em geral a faixa etária entre 18 a 64 anos acaba sem vacinação (BRIDGES, 2002). Estudos estão sendo realizados buscando aumentar a imunogenicidade da vacina e a quantidade de material. Também estão sendo utilizados recursos da biotecnologia e biologia molecular para a preparação de vacinas vivas ou atenuadas. Afora isto, também estão em testes o uso da vacina associada a adjuvantes.

A atual vacina licenciada é a trivalente que composta pelo hemaglutinina purificada ou parcialmente purificada por extração em detergente dos vírions inativados. Cada dose contém pelo menos 15 μ g de HA de cada cepa em sua formulação e estimula a imunidade devido a sua forma de administração parenteral (KEMBLE & GREENBERG, 2003). Em crianças, um estudo demonstrou uma alta protetividade (BELSHE et al, 1998). A vacina estimula a produção de anticorpos inibidores de hemaglutinina.

O uso da vacina com adjuvante, de administração parenteral, aumentaria a sua imunogenicidade, podendo assim diminuir a quantidade de HA disponível por dose. O uso de hidróxido de alumínio (HEHME, 2002) e compostos licenciados já mostraram conseguir uma elevação na imunogenicidade da vacina (NICHOLSON, 2001; PODDA, 2001; RIMMELZWAAN, 1997; RIMMELZWAAN, 2001).

Embora a administração da vacina pela via intranasal, em tese, pudesse aumentar a proteção e promover uma imunidade de mucosa a administração a vacina convencional mostrou-se ineficaz por esta via (WALDMAN, 1969). Em testes com modelo animal utilizando a vacina combinada com adjuvante tem tido resultados promissores (BOYCE, 2000; GLUECK, 2001; PLANTE, 2001). Também já existem testes com vacinas recombinantes e vacinas de ácidos nucléicos (HEINEN, 2002; NEIRYNCK, 1999; ULMER, 2002).

Como tratamento e uso profilático, hoje existem duas classes de drogas para a influenza: os inibidores da M2, amantadina e rimantadina, e os inibidores da neuraminidase, zanamivir e o oseltamivir. A ação dos inibidores de M2 só ocorre sobre os vírus do tipo A (HAY, 1989; SUGRUE & HAY, 1991). Apesar da sua eficácia comprovada, os efeitos colaterais como comprometimento hepático e renal acabam sendo pouco indicados para pessoas idosas (WILLS, 1989; WU et al, 1982). Os inibidores de NA possui atividade sobre os vírus dos tipos A e B (PALESE et al, 1974; VON ITZSTEIN et al, 1993), mas também possui restrições para pessoas com insuficiência renal (McCLELLAN & PERRY, 2001). O uso profilático é questionado devido à possibilidade da seleção de cepas resistentes. Mas

estudos mostraram a possibilidade das drogas como uso profilático durante os períodos de picos dos surtos da influenza (DOLIN et al, 1982; GALBRAITH et al, 1969; HAYDEN et al, 1999; MONTO et al, 1979; MONTO et al, 1999).

1.2.10 Diagnóstico clínico e laboratorial

A apresentação de sintomas clínicos não pode ser distinguido daqueles provocados por outros agentes etiológicos de doenças respiratórias, principalmente àqueles de origem viral. Para a determinação efetiva do agente, os diagnósticos clínicos são geralmente correlacionados aos períodos de surto (BEBY-DEFAUX et al, 2003). Os testes para influenza poderiam ajudar no tratamento clínico na administração de antivirais, porém testes rápidos e sensíveis para este fim ainda são muito caros.

A utilização das drogas antivirais pode ser embasada nos estudos epidemiológicos prévios, correlacionando o período de surto com a sintomatologia apresentada. Em geral o tratamento é bem aplicado para dois terços dos pacientes. Tosse e febre (37-38°C) são os maiores indicativos da influenza, mas podem não estar presentes em pessoas mais idosas. Entre 25 a 50% dos pacientes com doença gripal apresentam estes sintomas durante os períodos de surto (NICHOLSON et al, 2003).

A detecção do vírus influenza é feita por quatro vertentes principais: a cultura de células; detecção por sorologia; detecção do antígeno viral (por fluorescência com uso de anticorpos, imunoensaio enzimático e óptico ou atividade enzimática da NA) e detecção do ácido nucléico por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Em um laboratório convencional de diagnóstico para o vírus influenza as técnicas usadas são baseadas no isolamento viral e detecção sorológica. No isolamento viral são utilizadas as células “*primary rhesus monkey*” (PMK) ou “*Madin-Darby canine kidney*” (MDCK). O teste é aceito como padrão-ouro. As células são examinadas para análise de efeitos citopáticos e testadas por hemadsorção com confirmação por imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais contra o vírus influenza A e o vírus influenza B. O ensaio pode levar até 14 dias o que significa a inviabilidade como diagnóstico que resulte em um tratamento para o paciente. No entanto, o uso do cultivo é necessário, pois é a única forma de isolamento e detecção pela vigilância epidemiológica de novos subtipos virais circulantes o que afeta diretamente a formulação da vacina (GAVIN & THOMSON, 2003).

As técnicas sorológicas têm por base a detecção de títulos de anticorpos específicos contra o vírus na fase aguda da infecção e na fase de convalescença. São utilizados os ensaios de inibição da hemaglutinação, imunoenzimático, fixação do complemento e testes de

neutralização. É pouco recomendado como técnica de diagnóstico de suporte clínico sendo mais indicado como aliada de pesquisas epidemiológicas (COX & SUBBARAO, 1999).

Os diagnósticos para a detecção antigênica são considerados testes rápidos que podem ser realizados em apenas um dia. No entanto, os testes são passíveis de uma alta variabilidade de resultados que podem apresentar uma sensibilidade de 70 a 100% e uma especificidade de 80 a 100% (CHAN et al, 2002; DAISY et al, 1979; DOING et al, 1998; LEONARDI et al, 1994; RAY & MINNICH, 1987). Os testes também dependem do tipo, qualidade e transporte do material estudado, além disso, da idade e estado imunológico do paciente. Aspirados nasais são os melhores espécimes para coleta, já utilizando esfregaços de gargantas os testes apresentam uma performance muito baixa (COVALCIUC et al, 1999; HINDIYEH et al, 2000; KAISER et al, 1999; McQUILLIN et al, 1985; NOYOLA et al, 2000).

Para o desenvolvimento das técnicas moleculares de detecção viral, o principal problema enfrentando foi à variabilidade genética do vírus influenza que é muito alta. No entanto, o êxito foi obtido com a técnica de PCR associado com a transcrição reversa (RT-PCR) que mostrou uma sensibilidade muito superior a das técnicas convencionais (STEININGER et al, 2002), sendo 10^3 e 10^6 vezes mais sensível quando comparado a técnicas como cultura de célula e ELISA, respectivamente. Por meio do uso de iniciadores moleculares é possível determinar os subtipos virais, além disso, combinando múltiplos iniciadores específicos (RT-PCR multiplex) é possível realizar uma detecção molecular de múltiplos vírus em uma única reação (ELLIS et al, 1997; STOCKTON et al, 1998; FAN et al, 1998).

1.3. Importância do Estudo

Diante da falta de informações locais, torna-se necessário a realização desse trabalho no sentido de se obter dados sobre a ocorrência das infecções pelo vírus influenza em crianças atendidas em hospital da cidade de Fortaleza.

Uma série de questionamentos poderão ser respondidos após este estudo: Seria a prevalência das infecções pelo vírus influenza em crianças atendidas em hospital de Fortaleza semelhante à observada em outros locais do Brasil e do mundo? Existe um padrão de sazonalidade na região? As campanhas nacionais de vacinação contra a influenza ocorrem em um período adequado a realidade da cidade de Fortaleza? Há uma co-circulação dos vírus influenza A e B em Fortaleza? Quais os aspectos clínicos dessas infecções? Quais as características antigênicas dos vírus relacionados? Espera-se observar aspectos epidemiológicos distintos aos encontrados em outros estudos e mesmo, ao estudo anteriormente realizado nesta cidade, entretanto, nenhuma afirmação pode ser feita.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Conhecer o perfil epidemiológico das infecções respiratórias agudas causadas pelo vírus influenza em crianças atendidas no Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), na cidade de Fortaleza – Ceará, no período de janeiro de 2001 a julho de 2004.

2.2 Objetivos específicos

Verificar a prevalência do vírus influenza em relação às IRAs gerais e as IRAs causadas pelos vírus pesquisados durante o período de estudo;

Descrever a existência de um padrão de sazonalidade do vírus influenza em Fortaleza durante o período de janeiro de 2001 a julho de 2004;

Verificar a época de ocorrência dos períodos epidêmicos de influenza em Fortaleza em relação às campanhas nacionais de vacinação contra a gripe para idosos do Ministério da Saúde do Brasil;

Determinar a prevalência dos tipos antigênicos A e B do vírus influenza e dos subtipos virais A/H1 e A/H3 no período de janeiro de 2001 a julho de 2004.

Descrever as características epidemiológicas da infecção pelo vírus influenza na população estudada;

Observar a ocorrência dos subtipos virais (H1 e H3) do vírus influenza A no período de janeiro de 2003 a julho de 2004.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Descrição do estudo

3.1.1 Tipo de estudo

Este estudo foi do tipo observacional, analítico, transversal, realizado 43 meses de janeiro de 2001 a julho de 2004.

3.1.2 Local do estudo

O estudo foi realizado na cidade de Fortaleza, localizada no litoral do Ceará. Está compreendida em uma área de 331,14Km². Predomina o clima tropical, com umidade relativa média do ar de 77,0% e temperatura média anual em torno de 27°C. A Grande Fortaleza é composta pelos municípios de Aquiraz, Caucaia, Chorozinho, Eusébio, Guaiúba, Horizonte, Itaitinga, Maracanaú, Maranguape, Pacajús, Pacatuba e São Gonçalo do Amarante. De acordo com as últimas estimativas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) a população de Fortaleza até Julho de 2004 encontrava-se em 2.332.657 habitantes.

Os pacientes do estudo foram selecionados do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), localizado na cidade de Fortaleza. O HIAS é o maior hospital público em atendimento pediátrico do estado, é um centro de especialidades de atenção terciária e realiza em torno de 8615 atendimentos ambulatoriais, 4475 emergenciais e 613 internações mensalmente. As amostras foram coletadas em três setores distintos: ambulatórios, emergência (consultórios de pronto atendimento e observação), e enfermarias (sala de reanimação, enfermaria de serviço de pronto atendimento, enfermarias dos blocos A – bebês de 0-3 meses, D – cirurgia, E – pneumologia e unidade de terapia de urgência).

3.1.3 Critérios de inclusão

A seleção dos pacientes baseava-se nos seguintes critérios de inclusão:
Crianças atendidas nos setores de ambulatório, emergência e enfermaria do HIAS.
Quadro clínico compatível com IRAs das vias aéreas superiores e/ou inferiores
Presença de secreção nasofaríngea.
Tempo máximo de sete dias de início dos sintomas.

3.2 Coleta de dados

3.2.1 Coleta de material

A coleta da amostra clínica era feita em quatro dias pela manhã, entre segunda e sexta-feira, pelo coordenador do projeto ou estudantes de graduação e pós-graduação participantes de trabalhos de pesquisas realizadas no Laboratório de Virologia do Departamento de

Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará (LV-DPML-UFC). O espécime clínico escolhido foi secreção de nasofaringe (SNF), coletada por meio de aspiração. A coleta de SNF era feita por uma sonda uretral (número 4, 5 ou 6), acoplada a uma seringa de 20mL (Figura 2), segundo a técnica de Gardner e McQuillin, 1980. A sonda era introduzida em umas das narinas até a altura da nasofaringe (aproximadamente a distância média entre o ouvido e o nariz). O procedimento era realizado nas duas narinas quando o volume suficiente para a análise (em torno de 1mL) não era obtido na aspiração da primeira narina. Após a coleta o equipamento de coleta era armazenado em sua própria embalagem, identificado e acondicionado em caixa de isopor contendo gelo reciclável. Desta forma, as amostras eram transportadas até o LV-DPML-UFC, onde eram mantidas refrigeradas a 4°C por um período de no máximo 2 horas até o seu processamento.

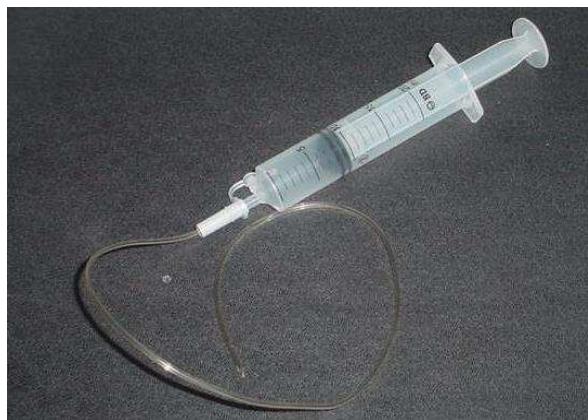


FIGURA 2 - Equipamento de aspiração de secreção da nasofaringe.

3.2.2 Entrevista e preenchimento da ficha epidemiológica

Após a avaliação clínica, a criança era encaminhada para o responsável pela coleta do material clínico. Antes da realização da coleta, os objetivos do estudo e a forma de coleta eram claramente informados. Após a obtenção do consentimento escrito do responsável pela criança (Anexo A), a coleta se iniciava. Os responsáveis pelas crianças respondiam a uma série de perguntas e forneciam os dados para preenchimento da ficha epidemiológica padronizada (Anexo B). Informações sobre aspectos clínicos, exame físico e definição do diagnóstico eram fornecidos pelo médico que prestava atendimento à criança.

3.3 Questões éticas

O estudo recebeu parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa do HIAS em 12 de junho de 2000, através ofício n° 08/00.

3.4 Processamento do material clínico

O processamento das amostras foi realizado com o tempo máximo de duas horas após a coleta. As secreções de nasofaringe eram colocadas em tubos de centrífuga de poliestireno com tampa em rosca, capacidade de 15mL, contendo 3mL de meio essencial mínimo com sais de Earle (MEM-E), adicionado de penicilina-estreptomicina, glutamina e bicarbonato de sódio. A secreção foi homogeneizada para que a células se desprendessem do muco, utilizando-se para isso uma pipeta Pasteur conectada a uma pêra de aspiração.

Uma alíquota de 1mL era colocada em criotubo e armazenado a -20°C . O material restante era centrifugado a 1500RPM (400xg), por 10 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante era armazenado em outro criotubo e também conservado a -20°C para a análise genética posterior. O sedimento era diluído em tampão salina-fosfato (PBS), em quantidade relativa à quantidade de sedimento disponível, de forma a proporcionar uma boa suspensão de células. Esta era aplicada em lâminas próprias para execução da reação imunofluorescência indireta (RIFI). Normalmente eram preparadas três lâminas, dependendo da quantidade de sedimento da amostra. A primeira era destinada à triagem, onde os dois orifícios centrais eram preenchidos, e outras duas eram destinadas ao teste específico, onde oito orifícios eram preenchidos (Anexo C). O sedimento era seco em estufa a 37°C e fixado em acetona a 4°C por 10 minutos. Após a evaporação da acetona, procedia-se a RIFI ou as lâminas eram estocadas a -20°C até o momento da análise. O esquema do processamento é visto no Anexo D.

3.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

O método de RIFI foi empregado como diagnóstico rápido das IRAs virais. Para a análise foi utilizado o *Respiratory Panel I Viral Screening & Identification Kit* (Chemicon Internacional Inc.), que é capaz de realizar identificações qualitativas dos vírus: vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus, influenza A e B e parainfluenza 1, 2 e 3.

Após o preparo das lâminas era realizado a RIFI. Caso as lâminas houvessem sido congeladas, elas passavam por um novo processo de secagem. Na lâmina de triagem, era feita a detecção por meio de anticorpos monoclonais, da classe IgG de camundongos, específicos para os vírus acima relatados. Foi aplicado em um orifício da lâmina 13 μL de anticorpos e 13 μL de soro controle negativo no outro orifício. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Em seguida eram lavadas em PBS por imersão por 4 minutos e submetidas à secagem na estufa a 37°C por, aproximadamente, 1 hora. O segundo anticorpo anti-IgG de camundongo, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína, era aplicado sobre os orifícios da lâmina. Eram mantidas nas mesmas condições de incubação da etapa anterior,

mantendo ao abrigo da luz. Após a secagem final das lâminas, aplicava-se o óleo de montagem e cobria-se com a lamínula. Para a visualização era utilizado um microscópio de imunofluorescência da marca Olympus, modelo BX-40, o esquema da imunofluorescência é visto no anexo E. Considerava-se como resultado positivo para a triagem a presença de inclusões fluorescentes no citoplasma ou no núcleo das células da nasofaringe.

A etapa de identificação qualitativa do vírus específico era procedida após o resultado da triagem ter sido positivo. Para isso utilizavam-se anticorpos monoclonais específicos para cada um dos sete vírus citados anteriormente. Adicionava-se por orifício 13 μ L de cada anticorpo específico e mais um com soro controle negativo. As etapas que procediam este momento são as mesmas da triagem (Anexo E). Considerava a identificação positiva para os vírus influenza A e B a presença de fluorescência uniforme no núcleo e/ou no citoplasma (Figura 3).

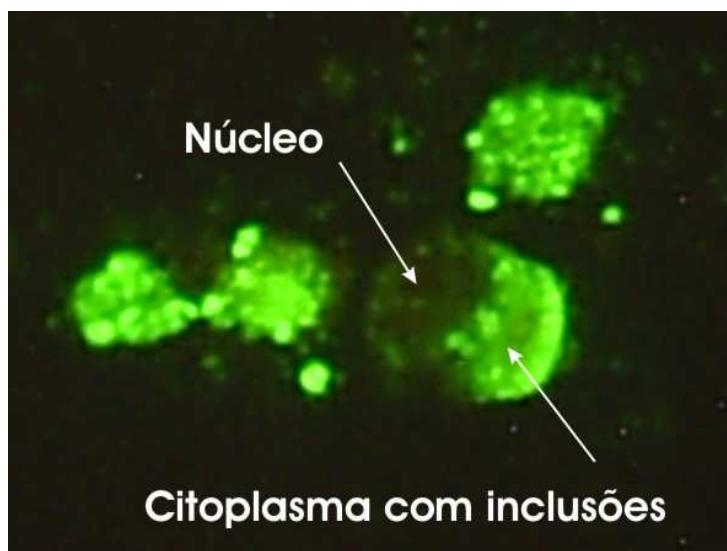


FIGURA 3 - Células positivas para vírus influenza por RIFI.

3.6 Tipagem e subtipagem gênica da hemaglutinina viral

Para identificar a hemaglutinina dos tipos virais identificados por imunofluorescência nos anos de 2003 e 2004, foi utilizada a técnica de PCR. A técnica de extração do RNA viral foi executada segundo Boom et al. (1990) e a técnica de PCR foi executada segundo Ellis et al. (1997). Esse procedimento foi realizado no Laboratório de Vírus Respiratórios do Departamento de Virologia do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro.

3.6.1 Extração do RNA viral

As amostras clínicas armazenadas e congeladas em MEM-E, foram descongeladas a temperatura ambiente. Em um tubo de 1,5mL de fundo cônicoo, foram adicionados 840 μ L de

tampão L6 (EDTA, Tris-HCl, Triton e GuSCN), 20 μ L de sílica e 150 μ L de amostra clínica. A suspensão era homogeneizada e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. A suspensão então era centrifugada a 10000rpm por 20 segundos e o sobrenadante era desprezado em solução de NaOH 10M. O precipitado foi lavado duas vezes em 1mL de tampão L2 (Tris-HCl, triton e GuSCN), duas vezes com 1mL de etanol a 70% e uma vez em 1mL de acetona PA a temperatura ambiente. O precipitado era seco a 56°C por 10 minutos. Por fim adicionava-se 30 μ L de água milli-Q livre de DNA e 1 μ L de inibidor de RNAses, e novamente mantidos a 56°C por 10 minutos. Após esse tempo, a suspensão era homogeneizada e centrifugada a 12.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante, contendo o ácido nucléico extraído, era coletado e, imediatamente realizava-se a transcrição reversa (Anexo F).

3.6.2 Transcrição Reversa (RT)

A reação de transcrição reversa (RT) é necessária para a obtenção do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA viral. Uma alíquota de 22,2 μ L do sobrenadante da extração era transferida para um tubo de 200 μ L contendo 17,8 μ L da mistura da RT (Tampão PCR 10X, dNTPs 10mM (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), MgCl 50mM, M-MLV RT 200U/ μ L, RNase out 40U/ μ L e iniciadores aleatórios (pdN)₆) (Gibco BRL). A solução final era incubada a 37°C por 1 hora para que ocorresse a RT, e a 95°C por 5 minutos desnaturando a enzima e parando a reação.

3.6.3 PCR

A reação de PCR era feita em duas fases de amplificação. Na primeira amplificação, uma alíquota de 20 μ L do produto de RT era transferida para um tubo de 200 μ L contendo 80 μ L da mistura de 1^a PCR (Tampão PCR 10X, MgCl 50mM, iniciadores de 1^a PCR 5pmol/ μ L, Taq polymerase 5U/ μ L e água Milli-Q livre de DNA). A mistura possui três pares de iniciadores específicos para a detecção dos subtipos virais do influenza A/H1 e H3 e o vírus influenza B. A reação de PCR a partir do cDNA é feita em termociclador com uma etapa inicial de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguidos por 30 ciclos de: 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 50°C por 1 minuto para o anelamento e 72°C por 1 minuto para a extensão.

Um novo ciclo de reação da polimerase em PCR aninhado (nested PCR) era realizado utilizando iniciadores internos aos produtos de primeira PCR. Uma alíquota de 2 μ L do produto da 1^a PCR era transferida para outro tubo de 200 μ L contendo 48 μ L de mistura da 2^a PCR (Tampão PCR 10X, MgCl 50mM, iniciadores de 2^a PCR 5pmol/ μ L, Taq polymerase 5U/ μ L, dNTPs 10mM e água Milli-Q livre de DNA). A segunda reação era feita em uma

etapa de desnaturação de 94°C por 2 minutos, seguida de: 94°C por 1 minuto para a desnaturação, 60°C por 1 minuto para o anelamento e 72°C por minuto para a extensão. Os iniciadores da reação de 1^a e 2^a PCR e os seus produtos estão no Quadro 1.

QUADRO 1 - Descrição dos iniciadores utilizados na reação de RT-PCR

| 1 ^a PCR | Iniciadores | Seqüência dos nucleotídeos | Tamanho do produto (pb) |
|-----------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| H3 | Iniciador direto AH3A | CAG ATT GAA GTG ACT AAT GC | 883 |
| | Primer reverse AH3DII | GTT TCT CTG GTA CAT TCC GC | |
| H1 | Iniciador direto AH1A | CAG ATG CAG ACA CAA TAT GT | 1015 |
| | Iniciador reverso AH1FII | AAA CCG GCA ATG GCT CCA AA | |
| B | Iniciador direto BHAA | GTG ACT GGT GTG ATA CCA CT | 900 |
| | Iniciador reverso BHADII | TGT TTT CAG CCA TAT TGG GC | |
| 2 ^a PCR | Iniciadores | Seqüência dos nucleotídeos | Tamanho do produto (pb) |
| H3 | Iniciador direto AH3B | AGC AAA GCT TTC AGC AAC TG | 591 |
| | Iniciador reverso AH3CII | GCT TCC ATT TGG AGT GAT GC | |
| H1 | Iniciador direto AH1B | ATA GGC TAC CAT GCA AAC AA | 944 |
| | Iniciador reverso AH1EII | CTT AGT CCT GTA ACC ATC CT | |
| B | Iniciador direto BHAB | CAT TTT GCA AAT CTC AAA GG | 767 |
| | Iniciador reverso BHACII | TGG AGG CAA TCT GCT TCA CC | |

3.6.4 Visualização dos Produtos Amplificados

A visualização do produto da 2^a PCR, foi realizado por eletroforese em gel de agarose a 1% (agarose wide range/routine 3:1) com tampão de corrida TBE (Tris-HCl, EDTA e ácido bórico) entre 90 a 100 volts por cerca de 1 hora.

No primeiro poço do gel de agarose, eram adicionados 3 μ L de marcador de peso molecular de 100 pares de bases (pb), “DNA ladder” (Gibco BRL), seguido de 5 μ L dos produtos de cada reação adicionado de 1 μ L de corante azul nos poços subseqüentes. Após a corrida eletroforética, o gel era submerso em solução de brometo de etídio 0,1% por 10 minutos e visualizado em luz ultravioleta (Wright et al, 1995). Os géis eram fotografados para seu arquivamento (Figura 4 e Anexo G).

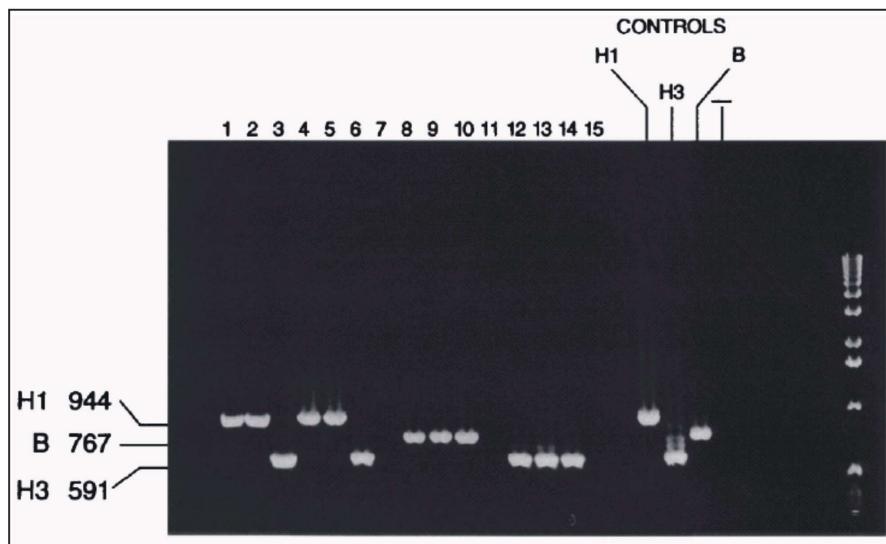


FIGURA 4 - Gel fotografado exibindo a diferença entre os três produtos de PCR para os vírus influenza A H1 e H3 e o vírus influenza B.

Fonte: Ellis et al., 1997

3.7 Análise estatística dos dados

A análise estatística foi realizada utilizando-se os programas estatísticos Epi-Info 6.04d e SSPS para Windows versão 10.0. Para a análise descritiva dos dados foram usados gráficos e tabelas. A transformação utilizada na variável dependente foi a raiz quadrada. A correlação de Sperman foi utilizada para analisar a relação entre os casos de gripe e o índice pluviométrico. O nível de significância estatística foi de 5,0%.

4. RESULTADOS

4.1 Prevalência das IRAs e infecções pelo vírus influenza

De janeiro de 2001 a julho de 2004 foram coletados 1950 amostras de secreção de nasofaringe, sendo 569 (29,2%) em 2001, 485 (24,9%) em 2002, 539 (27,6%) em 2003 e 357 (18,3%) em 2004. Desse total, 647 (33,2%) foram positivas para pelo menos um dos sete vírus pesquisados (VSR, adenovírus, vírus influenza A e B e parainfluenza 1, 2 e 3). Ao todo 156 amostras (8%) foram positivas para o vírus influenza (A e/ou B). A infecção pelo vírus influenza entre os IRAs virais apresentou uma prevalência de 24,1%. Na Figura 5 é possível ver a distribuição do número total de IRAs pelos vírus influenza e o total de IRAs virais nos quatro anos de estudo.

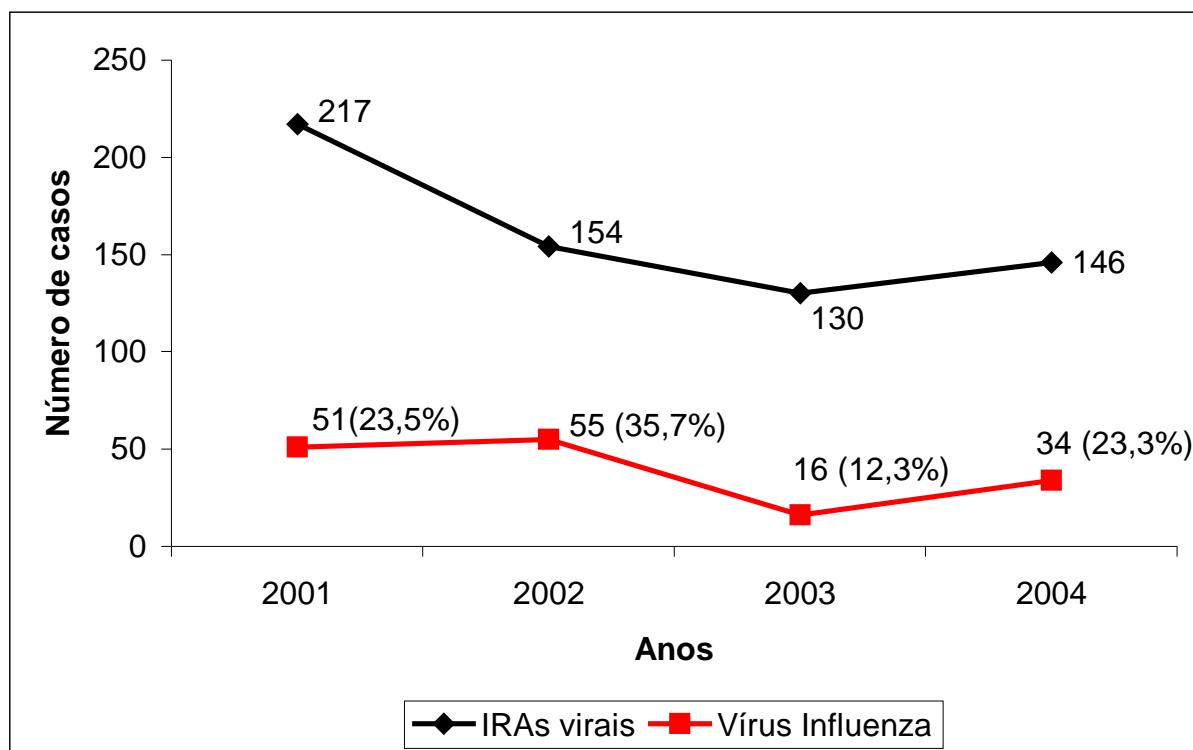


FIGURA 5 – Distribuição anual dos casos de infecção respiratória viral e infecção pelo vírus influenza.

Nos quatro anos de estudo a prevalência do vírus influenza A variou entre 8,2 a 10,7%, tendo representado 7,3% do total de amostras coletados em todo o trabalho. Já o vírus influenza B apresentou uma freqüência entre 0,3% à 0,7% e representando um total de 0,6% ao final da pesquisa. Ambos os vírus, influenza A e B co-circularam em todos os anos de estudo havendo uma predominância significativa do vírus influenza A (91%) em relação ao vírus influenza B (9%), quando se analisa somente os casos em que não houve co-infecção por esses dois vírus, ou seja dois casos que aconteceram no ano de 2003. Além desses casos, mais quatro co-infecções foram observados, sendo três entre o VSR e o influenza A e um caso

de VSR com o influenza B. Na tabela 1 é apresentada a prevalência dos vírus influenza A e B nos diversos anos de estudo.

TABELA 1- Prevalência dos vírus influenza a e b durante os quatro anos de estudo.

| Ano | Influenza A (%) | Influenza B (%) | Total |
|-------|-----------------|-----------------|-------|
| 2001 | 47 | 92 | 51 |
| 2002 | 52 | 94,5 | 55 |
| 2003 | 12 | 75 | 25 |
| 2004* | 33 | 97 | 3 |
| Total | 144 | 92,3 | 156 |

*As amostras nesse ano foram coletadas até o mês de julho.

**Não foram incluídas os dois casos de co-infecção pelos vírus influenza A e B;

4.2 Sazonalidade

As IRAs foram detectadas durante todos os meses do ano, tendo apresentado picos de atividades durante o primeiro semestre. O vírus influenza foi detectado entre os meses de janeiro a julho, sendo observado, raramente, no mês de setembro. Em 2001, o período epidêmico começou em março e terminou em junho, com pico no mês de maio. Nesse ano foram detectados dois casos esporádicos no mês de setembro. No ano de 2002, o vírus circulou em Fortaleza de janeiro a maio, com detecção máxima em abril. Em 2003, o vírus se fez presente somente no mês de abril. E em 2004, o surto teve início em janeiro e se estendeu até março, com pico em fevereiro. Ocorreram três casos isolados em julho (Figura 6).

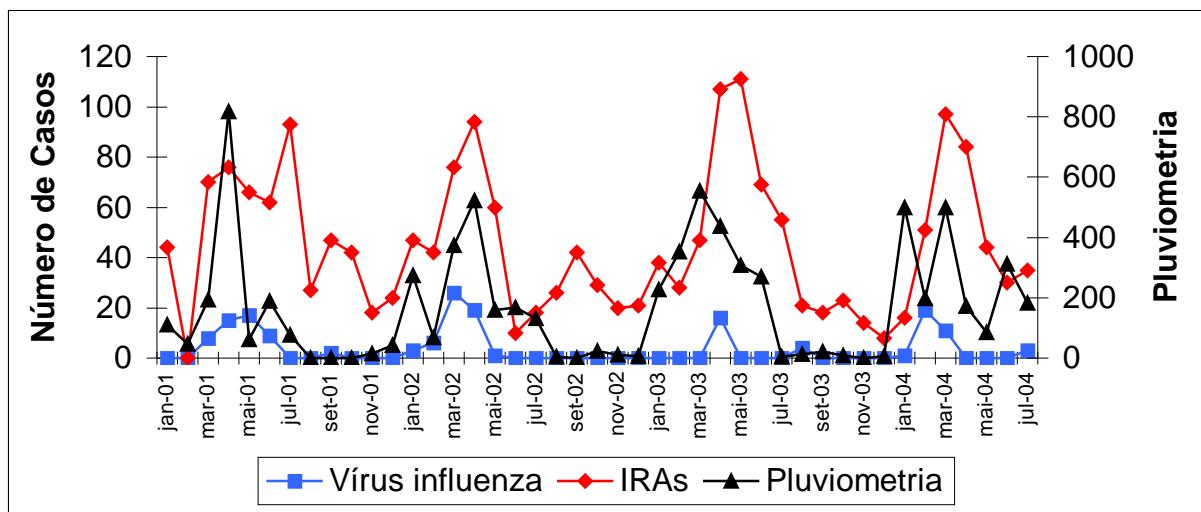


FIGURA 6 – Distribuição mensal dos casos de infecção respiratória aguda, casos de infecção por vírus respiratórios e infecção pelo vírus influenza.

Na Figura 7, usando a correlação de Sperman, pode-se observar a associação linear positiva significativa, $p<0,001$, estimada em 0,589, entre a raiz quadrada positiva dos casos de

IRAs pelo vírus influenza a média do índice pluviométrico observado durante todo o período do estudo.

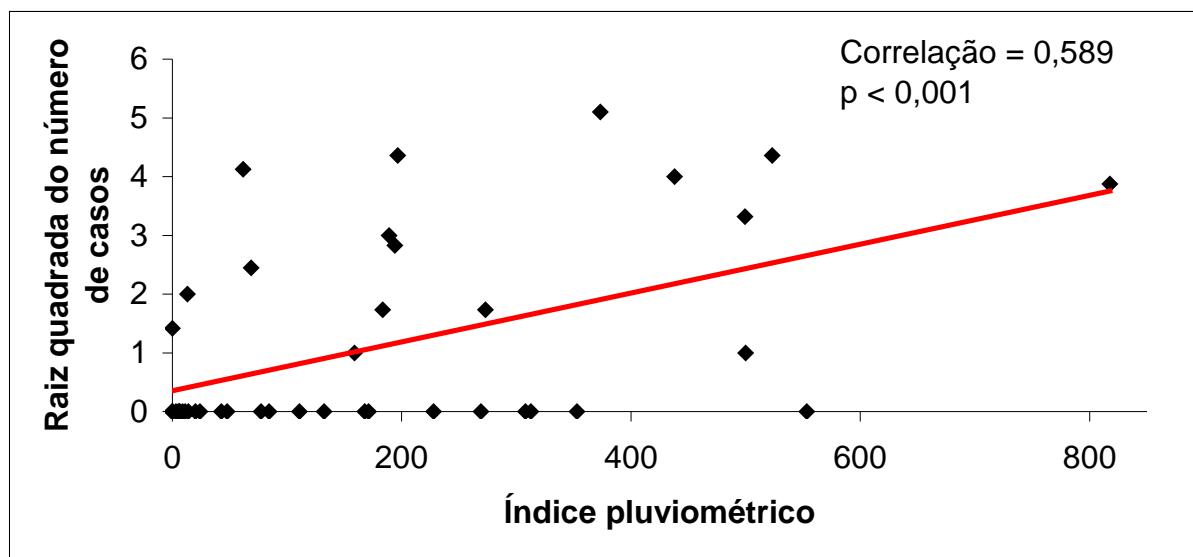


FIGURA 7 – Correlação entre os casos de infecção pelo vírus influenza e a pluviometria.

Com relação aos tipos virais circulantes, os vírus influenza A apresentaram pico de infecção no ano de 2001 no mês de maio, em 2002 ocorreu em março, em 2003 no mês de abril e em 2004 em fevereiro. Já o vírus influenza B teve pico de infecção em 2001 em maio, em 2002 e 2003 ocorreu no mês de abril e em 2004 no mês de fevereiro. Em todos os anos o vírus co-circularam durante o período de surto (Figura 8).

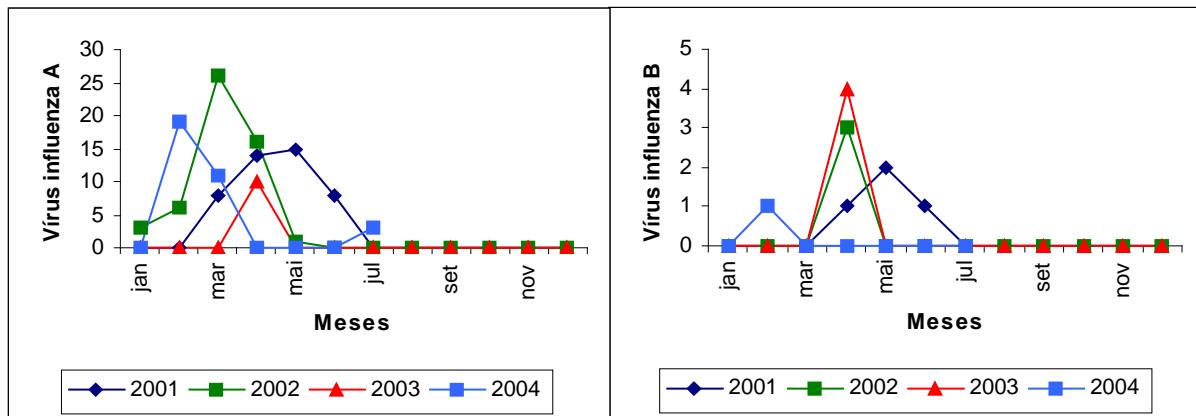


FIGURA 8 – Distribuição mensal dos tipos virais A e B do vírus influenza durante os quatro anos de estudo.

4.3 Caracterização da população de estudo

Do total de crianças, 1033 (53%) eram do sexo masculino e 917 (47%) do sexo feminino. Em relação à idade dos pacientes, 454 (23%) tinham de zero a seis meses, 473 (24,3%) tinham de seis a doze meses, 510 (26,2%) tinham de doze a vinte e quatro meses, 366 (18,8%) tinham de vinte e quatro a sessenta meses e 147 (7,5%) tinham acima de sessenta meses.

Dos 1950 pacientes, 908 (46,6%) foram atendidos nos ambulatórios, 748 (38,3%) foram atendidos no serviço de emergência e 294 (15,1%) foram atendidos nas enfermarias. Com relação ao tipo de infecção, 920 (45,5%) apresentaram infecção de vias aéreas superiores (IVAS) e 1030 (54,5%) de vias aéreas inferiores (IVAI).

Dados demográficos gerais sobre a população de estudo, como idade, sexo, local de atendimento e diagnóstico clínico estabelecidos para crianças infectadas ou não por influenza são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – Caracterização geral da população do estudo

| Parâmetros | Vírus influenza | | Total | | |
|-------------------------------------|-----------------|--------|-------------|--------|-------------|
| | Positivos | (%) | Negativos | (%) | |
| Local de atendimento | | | | | |
| Ambulatório | 76 | (48,7) | 832 | (46,3) | 908 |
| Emergência | 62 | (39,7) | 686 | (38,2) | 748 |
| Enfermaria | 18 | (11,6) | 276 | (15,5) | 294 |
| Sexo | | | | | |
| Masculino | 73 | (46,8) | 960 | (53,5) | 1033 |
| Feminino | 83 | (53,2) | 834 | (46,4) | 917 |
| Idade (Meses) | | | | | |
| 0 → 6 | 12 | (7,7) | 442 | (24,6) | 454 |
| 6 → 12 | 25 | (16,0) | 448 | (25,0) | 473 |
| 12 → 24 | 49 | (31,4) | 461 | (25,6) | 510 |
| 24 → 60 | 43 | (27,5) | 323 | (18,0) | 366 |
| > 60 | 27 | (17,3) | 120 | (6,8) | 147 |
| Diagnóstico Clínico | | | | | |
| Infecção das vias aéreas superiores | 102 | (65,4) | 818 | (45,5) | 920 |
| Infecção das vias aéreas inferiores | 54 | (34,6) | 976 | (54,5) | 1030 |
| Total | 156 | | 1794 | | 1950 |

Entre as 156 crianças infectadas pelos vírus influenza A ou B, 83 eram do sexo feminino (53,2%) e 73 do sexo masculino (46,8%). Observou-se um discreto predomínio, sem significância estatística, de crianças do sexo feminino em relação ao sexo masculino.

Com relação às diversas faixas etárias das crianças com influenza observou-se um predomínio sem significância estatística de crianças com idade superior a 12 meses até 24 meses, que representaram 31,4% do total das crianças com essa infecção. A maioria das crianças com infecção pelo vírus influenza tinha até dois anos de idade (55,1%). Um total de 27 crianças com influenza tinham mais de cinco anos de idade, representando cerca de 18,3% do total de crianças nessa faixa etária incluída nesse estudo e 17,3% das crianças com influenza.

Em relação ao local de atendimento, 76 (48,7%) casos foram atendidos em ambulatórios, 62 (39,7%) foram atendidos no setor de emergência e 18 (11,6%) nas enfermarias.

Um total de 102 crianças, ou seja, a maioria dos pacientes com infecção pelo vírus influenza apresentou infecção diagnosticada como IVAS (65,4%). Outras 54 crianças com influenza apresentaram infecção diagnosticada como IVAI (34,6%).

A freqüência de influenza entre os sexos foi semelhante em todas as faixas etárias (Tabela 3).

TABELA 3 – Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o sexo e a idade.

| Idade (meses) | Masculino (%) | Feminino (%) | Total (%) |
|---------------|---------------|--------------|-------------|
| 0 – 12 | 18 (24,6) | 19 (22,9) | 37 (23,7) |
| 12 – 24 | 21 (28,8) | 28 (33,7) | 49 (31,4) |
| 24 – 60 | 20 (27,4) | 23 (27,7) | 43 (27,6) |
| > 60 | 14 (19,2) | 13 (15,7) | 27 (17,3) |
| Total | 73 (46,8) | 83 (53,2) | 156 (100,0) |

Em relação à idade das crianças por setor de atendimento, observou-se a maioria das crianças atendidas nas enfermarias tinha até dois anos de idade (88,9%). Nenhuma criança com mais de cinco anos de idade foi atendida nas enfermarias por infecção pelo vírus influenza. Os atendimentos na emergência (50,1%) e nos ambulatórios (51,3%) apresentaram freqüências semelhantes para crianças com até dois anos de idade e aquelas com mais de dois anos de idade. (Tabela 4).

TABELA 4 – Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o setor de coleta das amostras e a idade.

| Idade (meses) | Setor de coleta da amostra | | | Total (%) |
|---------------|----------------------------|----------------|-----------------|----------------|
| | Ambulatórios (%) | Emergência (%) | Enfermarias (%) | |
| 0 → 12 | 12 (15,8) | 17 (27,5) | 8 (44,4) | 37 (23,6) |
| 12 → 24 | 27 (35,5) | 14 (22,6) | 8 (44,5) | 49 (31,4) |
| 24 → 60 | 23 (30,2) | 18 (29,0) | 2 (11,1) | 43 (27,6) |
| > 60 | 14 (18,5) | 13 (20,9) | 0 (0,0) | 27 (17,3) |
| Total | 76 (48,7) | 62 (39,7) | 18 (11,6) | 156 (100,0) |

As IVAI foram mais freqüentes (68,5%) entre as crianças de até dois anos de idade. As IVAS foram mais freqüentes (74,5%) que as IVAI em crianças acima de um ano de idade (Tabela 5).

TABELA 5 – Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o diagnóstico clínico e a idade.

| Idade (meses) | IVAS (%) | IVAI (%) | Total (%) |
|---------------|---------------|--------------|----------------|
| 0 → 12 | 15 (14,7) | 22 (40,7) | 37 (23,6) |
| 12 → 24 | 34 (33,3) | 15 (27,7) | 49 (31,4) |
| 24 → 60 | 30 (29,4) | 13 (24,1) | 43 (27,6) |
| > 60 | 23 (22,6) | 4 (7,5) | 27 (17,4) |
| Total | 102 (65,4) | 54 (34,6) | 156 (100,0) |

O diagnóstico mais freqüente (57,8%) no ambulatório, relativo as infecções causadas pelo vírus influenza, foi a IVAS, enquanto na emergência e enfermarias (44,4 e 24,1% respectivamente) foi a IVAI. Nas enfermarias a freqüência de IVAI é quase cinco vezes a de IVAS, enquanto na emergência ambos os tipos de diagnósticos apresentam uma razão de freqüências de 1,2 aproximadamente (Tabela 6).

TABELA 6 – Distribuição da população de crianças com infecção pelo vírus influenza, segundo o diagnóstico clínico e o setor de coleta das amostras.

| Setor de Coleta da amostra | IVAS (%) | IVAI (%) | Total (%) |
|----------------------------|---------------|--------------|----------------|
| Ambulatórios | 59 (57,8) | 17 (31,5) | 76 (48,7) |
| Emergência | 38 (37,3) | 24 (44,4) | 62 (39,7) |
| Enfermarias | 5 (4,9) | 13 (24,1) | 18 (11,6) |
| Total | 102 (65,4) | 54 (34,6) | 156 (100,0) |

4.4 Vacinação

As campanhas nacionais de vacinação para a prevenção contra influenza iniciaram sempre no mês de abril. A campanha de vacinação de 2001 ocorreu no período de 22 de abril a 11 de maio. Em 2002, a campanha ocorreu entre os dias 12 e 28 de abril. No ano de 2003 ocorreu entre 12 e 30 de abril e em 2004 ocorreu entre os dias 17 e 30 de abril. Em 2001, o pico de infecção dos vírus influenza ocorreu no mês de maio, mês seguinte à campanha de vacinação, no ano de 2002, o pico de infecção do vírus influenza ocorreu no mês que antecedeu a campanha, em 2003 o pico ocorreu durante a campanha e tornou a ocorrer em 2004 o pico de epidêmico do vírus anteceder a época da vacinação (Figura 9).

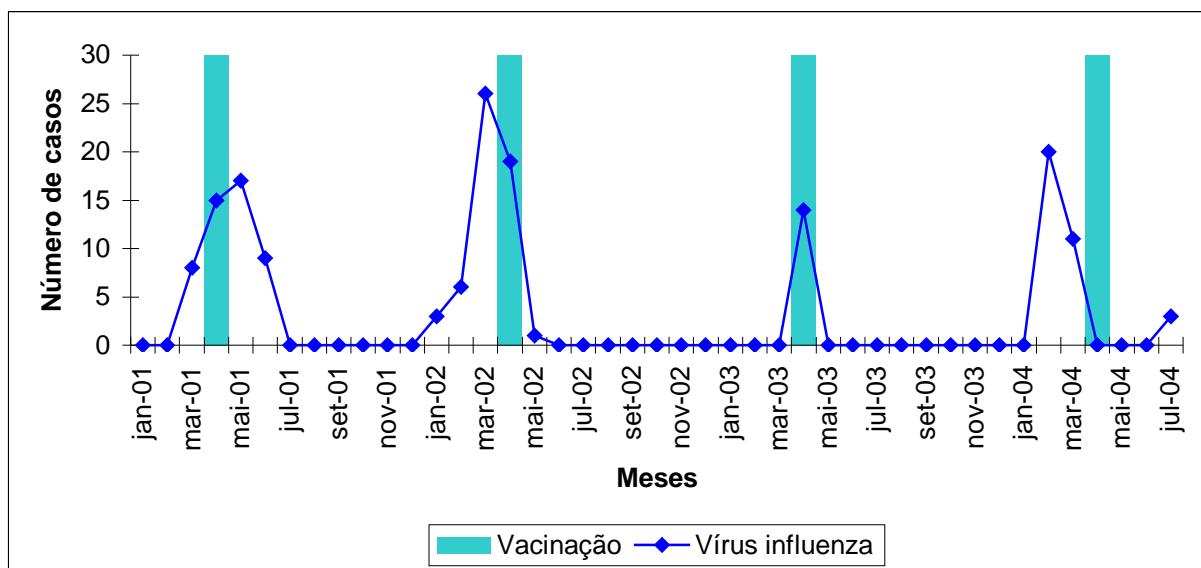


FIGURA 9 – Distribuição mensal de casos de infecção pelo vírus influenza e dos períodos das campanhas de vacinação contra a gripe nos quatro anos do estudo.

4.5 Resultados das técnicas

4.5.1 RIFI

Todas as 1950 amostras coletadas foram analisadas pela RIFI. Foram 156 amostras positivas para o vírus influenza das quais 142 (91%) foram positivas para o vírus influenza A e 12 (7,7%) para o vírus influenza B. As co-infecções demonstradas através dessa técnica foram: quatro entre o vírus influenza A e o VSR; um caso entre o vírus influenza B e o VSR e dois casos entre os vírus influenza A e B.

4.5.2 RT-PCR

Foi efetuada a análise de hemaglutinina somente nas amostras dos anos 2003 e 2004 que foram positivas por RIFI, excetuando as três últimas amostras positivas coletadas. Das 47 amostras testadas pela RIFI e RT-PCR, 39 (83,0%) apresentaram concordância e 8 (17,0%)

foram negativas por RT-PCR. Nos anos de 2003 e 2004, 11 (68,8%) e 28 (90,3%) das amostras foram positivas para RT-PCR respectivamente (Tabela 7). Nas figuras 10 e 11 são apresentados os resultados da análise das amostras de 2003 e 2004 pela RT-PCR. A lista de amostras analisadas pela RT-PCR é apresentada no Apêndice B.

TABELA 7 – Concordância entre os resultados obtidos pela RIFI e RT-PCR.

| | | RT-PCR | | | | Total | |
|-----------------|-------|--------|----------|--------|----------|--------|----|
| | | Ano | Positivo | (%) | Negativo | | |
| RIFI (positivo) | 2003 | | 11 | (68,8) | 5 | (31,2) | 16 |
| | 2004 | | 28 | (90,3) | 3 | (9,6) | 31 |
| | Total | | 39 | (83,0) | 8 | (17,0) | 47 |

Das amostras, 37 (78,7%) foram positivas para o vírus influenza A H3, 2 (4,3%) para o vírus influenza B (Tabela 8 e Figura 10).

TABELA 8 – Distribuição da ocorrência dos tipos e subtipos virais do vírus influenza durante os anos de 2003 e 2004.

| Ano | Influenza A H3 (%) | Influenza B (%) | Negativos (%) | Total |
|-------|--------------------|-----------------|---------------|-------|
| 2003 | 10 (62,5) | 1 (6,3) | 5 (31,2) | 16 |
| 2004* | 27 (87,1) | 1 (3,2) | 3 (9,7) | 31 |
| Total | 37 (78,7) | 2 (4,3) | 8 (17,0) | 47 |

* A coleta de amostras foi realizada até julho 2004.

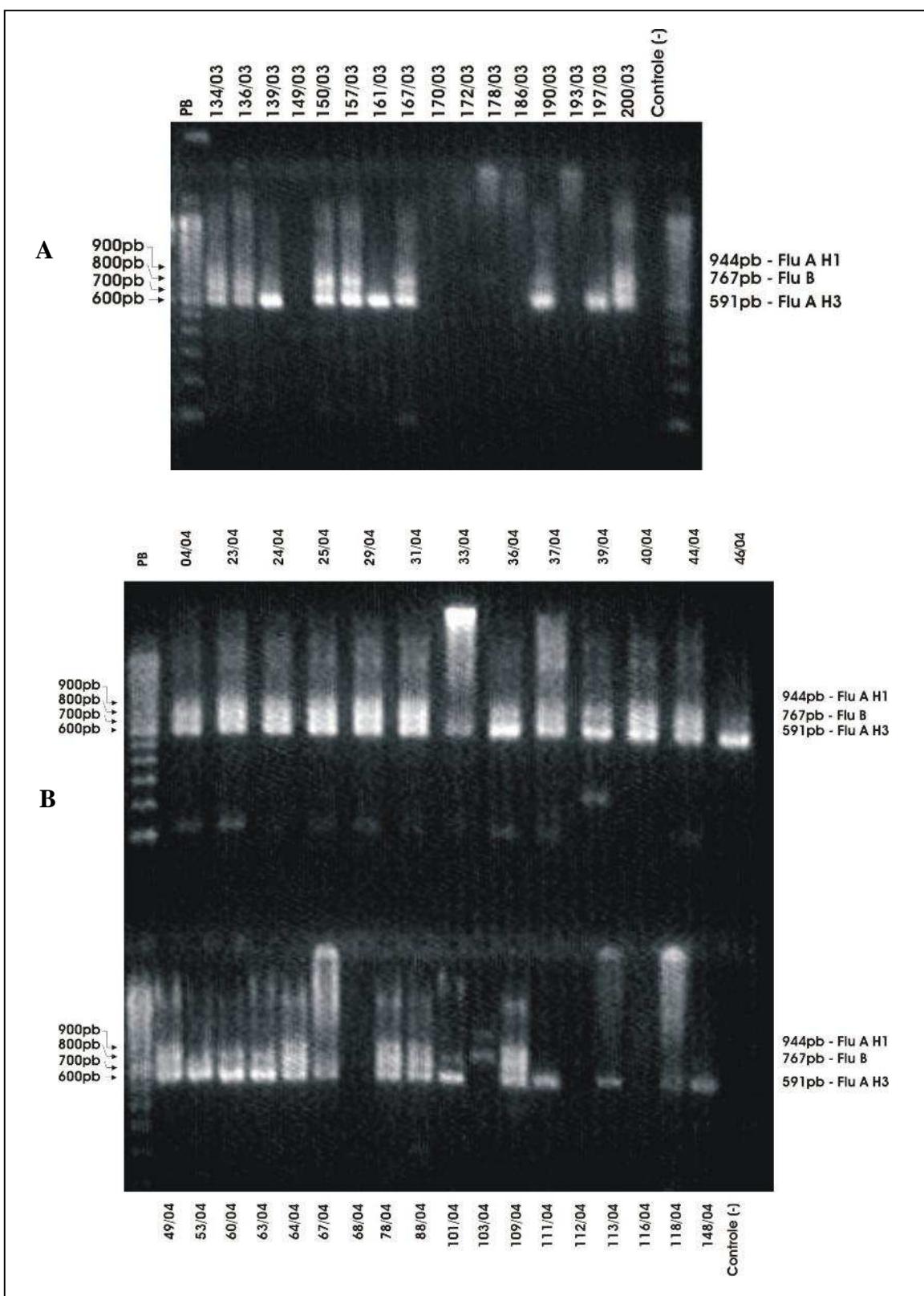


FIGURA 10 – Resultados da técnica de PCR em amostras positivas por RIFI dos anos 2003 (A) e 2004 (B).

5. DISCUSSÃO

5.1 Prevalência do vírus influenza

As taxas de prevalência de infecções pelo vírus influenza em humanos segundo diversos estudos varia entre 1% a 26,4% (SUTMÖLLER et al., 1995; NICHOLSON et al., 2003; RAMAMURTY et al., 2005; SIMONSEN, 2001; OLIVEIRA et al., 2004). Nesse estudo o vírus influenza apresentou uma prevalência geral de 8% entre todos os casos de IRAs, e foi o segundo agente etiológico mais freqüente de IRAs virais com uma prevalência de 24,1%, após o VSR que teve uma prevalência de 63,2%. Esta taxa está abaixo do que alguns estudos relatam sobre a prevalência mundial, pois entre crianças, estima-se que seja de 12,5% a 20% (NICHOLSON et al., 2003; SANNI et al., 2004). A alta susceptibilidade das crianças ao vírus influenza influencia as maiores taxas de prevalência das infecções por esse agente nesse grupo da população quando comparada aquelas encontradas entre adultos (MUNOZ, 2002), mesmo assim, estas taxas podem variar bastante, inclusive analisando estudos que incluem apenas crianças.

Em vários países do mundo, foram realizados levantamentos epidemiológicos sobre influenza infantil, utilizando o mesmo material clínico e o mesmo método de triagem de infecções por vírus influenza utilizados nesse estudo. Pode-se constatar que ocorre uma grande variação nas taxas de prevalência dessas infecções. Nos Estados Unidos, durante o ano de 2004, de 11916 pacientes que apresentaram IRA, 0,5% foram positivos para vírus influenza (CDC, 2004). Na Espanha, no período de 1995 a 1996, 377 amostras foram coletadas, 15,7% foram positivas para influenza (REINA et al., 1996). Na França, de 2001 à 2002, foram coletados 472 amostras, o vírus influenza foi detectado em 24,2% das crianças (SANNI et al, 2004). Em Singapura. onde foram coletadas 12354 amostras entre os anos de 1990 e 1994, a prevalência do vírus foi de 11% (CHEW, et al., 1998). Em Caracas, nos anos de 1995 a 1996, foram coletadas 126 amostras de secreção nasofaringea, das quais 8,7% foram positivas para o vírus influenza (ZAMBRANO et al., 1999). No Quênia, entre 1981 e 1982, foram coletadas 882 amostras de aspirados nasofaríngeos, sendo 2% foram positivas para o vírus influenza (HAZLETT et al., 1988). Na Argentina, de 18561 aspirados de nasofaringe coletados no período de 1998 a 2002, testados por imunofluorescência indireta, o vírus influenza foi detectado em 2,6% das amostras (VIEGAS et al., 2004). Em Taiwan, entre os anos de 1995 a 1997, foram coletadas 910 amostras, e a prevalência do vírus influenza foi de 12,2% ((b) LIN, 2004). No Japão, no período de 1998 a 2001, foram coletadas 3336 amostras, destas 38,7% foram positivas para o vírus influenza (KASE, et al., 2004). Observando-se que nestes estudos a variação ocorreu entre 0,5% e 38,7%, a taxa de prevalência encontrada em nosso estudo encontra-se em acordo com o que é relatado por

outros países do mundo. A ampla variação de prevalência pode ser explicada por alguns fatores que podem influenciar as taxas apresentadas: a população estudada, o tamanho da amostragem; o tempo e o período em que foi realizado o estudo; a metodologia empregada e até mesmo, questões inerentes a região estudada, como fatores climáticos.

Estas mesmas variações foram encontradas no Brasil, intra e inter-regionalmente. A taxa de prevalência de infecções por influenza desse estudo apresentou-se em acordo com o que se tem obtido a partir de estudos brasileiros. No Brasil as taxas de prevalência de infecção pelo vírus influenza variaram de 1% a 26,4%. Os resultados preliminares da vigilância de influenza realizada pelo Ministério da Saúde, onde, entre o período de 2000 a 2003, foram coletadas 2887 amostras de secreção da nasofaringe, cerca de 14,7% das amostras foram positivas para o vírus influenza (SVS, 2004). Entre 101 amostras respiratórias coletadas de pacientes com IRA em Belém, no ano de 2000, 6% dessas amostras foram positivas para o vírus influenza (RODRIGUES et al., 2004). Em uma investigação realizada no Rio Grande do Sul, de 1990 a 1992, foram colhidas 862 amostras de secreção de nasofaringe onde 1,7% foi positiva para o vírus influenza (STRALIOTTO et al., 2002). No Rio de Janeiro, entre os anos de 1987 e 1989, foram colhidas 827 amostras de pacientes apresentando IRA, destas amostras, 1% foi positiva para o vírus influenza (SUTMÖLLER et al., 1995). Em um estudo realizado em 2002, relativo às regiões sudeste e centro-oeste, foram coletadas 510 amostras de secreção de nasofaringe de pacientes adultos e crianças, onde 17,13% foram positivas para o vírus influenza (PAIVA et al., 2003).

Segundo estudos realizados no Nordeste, as taxas de prevalência encontradas variam bastante. Em um estudo realizado na Bahia, no ano de 1998, foram analisadas 482 casos de infecção respiratória infantil, onde 6,8% dos casos associados a vírus foram causados pelo vírus influenza (MOURA 2001). Em Maceió, entre os anos de 2000 e 2002, um total de 488 amostras de secreção de nasofaringe e “swab” combinados oral/ nasal foram submetidos à RIFI. O vírus influenza causou 26,4% dos casos (OLIVEIRA et al., 2004). O resultado apresentado é a mais alta taxa de prevalência de influenza encontrada em um estudo brasileiro. Esse estudo é um relato preliminar da vigilância de influenza na cidade de Maceió, assim sendo foram selecionados somente os casos “típicos” de influenza em crianças e adultos atendidos em um hospital e em um centro de saúde dessa cidade que funcionam como unidades sentinelas. No início da década de 90 foram publicados os resultados do primeiro estudo sobre pesquisa de IRAs em crianças da cidade de Fortaleza realizada nos anos de 1984 a 1986 (ARRUDA et al., 1991). Nesse estudo a seleção dos pacientes era feita em visitas domiciliares e o atendimento dos pacientes e a coleta das amostras clínicas foram realizados em ambulatórios. A prevalência das infecções por vírus influenza nele encontrada foi de

1,7%, uma taxa bem inferior àquela encontrada no nosso estudo. Devemos ressaltar que o tempo de realização e o número de amostras coletadas nos dois estudos diferiram bastante. O tipo de estudo e toda a complexidade que é gerada na execução de um estudo realizado com visitas domiciliares, pode ter sido o fator decisivo para o resultado encontrado na primeira pesquisa feita sobre viroses respiratórias em Fortaleza (ARRUDA et al., 1991).

O vírus influenza foi o segundo vírus mais prevalente desse estudo logo após o VSR. Dois estudos realizados no Brasil apresentam essa mesma ordem de prevalência de vírus. Um deles foi realizado com crianças atendidas em enfermarias e emergência de um hospital pediátrico de Salvador durante o ano de 1998 (MOURA., 2001). As taxas de prevalência encontradas para VSR e influenza foram de 17,4% e 6,8%, respectivamente. Resultados da vigilância de influenza no Brasil, que investiga a etiologia de viroses respiratórias em adultos e crianças, apresentam o VSR e o vírus influenza como vírus mais prevalentes em casos de infecções respiratórias, com taxas de prevalência de 26,7% e 14,7%, respectivamente (SVS., 2004).

O fato de termos encontrado o vírus influenza como segundo vírus mais prevalente nesse estudo também chama a atenção, pois, segundo vários estudos realizados tanto no Brasil como em outros países, outros vírus têm apresentado maior prevalência que o influenza. Resultados de dois trabalhos sobre IRAs virais realizados em Fortaleza e Salvador mostraram o rinovírus e o parainfluenza/ rinovírus e enterovírus como agentes mais prevalentes, respectivamente (ARRUDA et al.,1991; SOUZA et al.,2003). Ambos foram realizados com populações de estudos diferentes. Aquele realizado em Fortaleza incluiu apenas crianças atendidas em visitas domiciliares e ambulatórios e o de Salvador foi realizado com crianças a tendidas em uma creche. Os enterovírus e o vírus influenza foram os vírus mais prevalentes em pacientes ambulatoriais segundo dados de um estudo realizado em Taiwan (TSAI et al., 2001). No Rio de Janeiro e Porto Alegre o VSR e o adenovírus foram os agentes mais prevalentes de IRAs infantis conforme resultados de dois estudos que utilizaram uma população de crianças atendidas em vários setores hospitalares (NASCIMENTO et al., 1991; STRALIOTTO et al., 2002). O vírus influenza aparece como agente mais prevalente de IRAs em um estudo realizado em Maceió, onde a população estudada era composta de crianças e adultos atendidos em um hospital e um centro de saúde daquela cidade (Oliveira et al.,2004). Devemos ressaltar que nesse estudo, os aspectos clássicos de influenza foram um dos critérios para seleção dos pacientes. A influenza clássica é bem mais fácil de ser diagnosticada em adultos que em crianças, que podem apresentar mais comumente doença febril que em outras viroses (MUNOZ, 2003). Portanto, por incluir adultos nesse estudo ficou mais fácil selecionar casos de influenza.

5.2 Vigilância epidemiológica

A OMS coordena uma rede mundial de vigilância de influenza, cujo objetivo é detectar e prevenir surtos de gripe, que ocorrem pela circulação de cepas mais recentes dos vírus em uma população susceptível (AULT, 2004; KITLER et al., 2002; LAYNE et al., 2001; WEBBY & WEBSTER, 2003). A idéia surgiu em 1947 e hoje mobiliza uma rede de 110 laboratórios nacionais em 80 países, coordenados pelos centros de referência que são vinculados a OMS: Instituto de Pesquisas Médicas do Reino Unido, na Inglaterra, Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC), nos Estados Unidos, O CSL Limited, na Austrália e o Instituto de Doenças Infecciosas, no Japão. No Brasil existem três grandes institutos que se integram a esta rede: o Instituto Oswaldo Cruz, no estado do Rio de Janeiro, o Instituto Evandro Chagas, no estado do Pará e o Instituto Adolfo Lutz, no estado de São Paulo. O primeiro é considerado laboratório de referência nacional, enquanto os outros dois são de referência regional. A rede foi ampliada com a adesão de LACENs de vários estados. Mesmo assim, vigilância da influenza no Brasil apresenta ainda alguns obstáculos, como abrangência ainda limitada das unidades sentinelas; a infra-estrutura deficiente da rede de laboratórios, principalmente no que diz respeito à caracterização completa dos vírus identificados; a validação dos indicadores epidemiológicos; o aperfeiçoamento dos mecanismos de gerenciamento de dados e a produção e disseminação de informação sobre a gripe que hoje ainda é muito restrita (SVS, 2004).

5.3 Tipos e subtipos

No que se refere à circulação dos diferentes tipos de influenza observou-se em Fortaleza a circulação dos tipos A e B nos quatro anos deste estudo, com predominância elevada para o tipo A. Outros achados semelhantes no nordeste foram relatados na Bahia (MOURA et al., 2003) e em Alagoas (OLIVEIRA et al., 2004), dentro deste período. Em um estudo realizado a nível nacional, entre os anos de 2000 e 2003, foi relatada a presença dos dois tipos virais, com predomínio do vírus influenza A (81,7%) sobre o vírus influenza B (SVS, 2004).

Tipos e subtipos predominantes de vírus influenza variou conforme a região geográfica nesses quatro anos de estudo (estações de influenza 2001-2002; 2002-2003; 2003-2004 e 2004-2005).

No período 2001- 2002 o tipo A (H3N3) predominou na África, Américas, Europa e Oceania e os tipos A/H1N1 e A/H1N2 foram relatados esporadicamente (CDC, 2002). Nesse

mesmo período o vírus influenza B predominou em países como a Áustria, Chile, Eslovênia, Eslováquia, Grécia, Itália, Índia, Paraguai, Rússia e Suíça (CDC, 2002).

No Hemisfério Norte durante a estação de influenza 2002-2003 observou-se a co-circulação do vírus influenza A/H1 e A/H3N2 e o vírus influenza B. A co-circulação dos vírus influenza A e B foi relatada na Ásia, Europa e América do Norte. Na Europa e Ásia, a maioria dos vírus influenza A subtipados era A/H3N2, mas o subtipo A/H1 foi o subtipo A predominante no Canadá e no México (CDC, 2003). Nos Estados Unidos o subtipo A/H1 e vírus influenza B foram relatados em freqüências semelhantes. O vírus influenza B predominou em países como a Bélgica, Espanha, França, Portugal, Romênia (CDC, 2003). Nesse período o vírus influenza B predominou na Argentina, Brasil, Chile, Guiana Francesa, México e Peru (CDC, 2003).

É importante relatar que durante o mês de fevereiro de 2003 foram relatados dois casos de infecção humana pelo vírus influenza aviário A/H5N1 em membros de uma mesma família de Hong Kong. Um foi associado a uma criança que se recuperou totalmente após hospitalização e o segundo caso ocorreu no pai dessa criança que evoluiu para óbito (CDC, 2003). Também no mês de fevereiro de 2003, surtos de influenza aviária causados pelo vírus influenza A/H7N7, um subtipo altamente patogênico, foram relatados em galinhas na Holanda. Casos de infecção humana por esse subtipo foram confirmados em 83 em pessoas que cuidavam desses animais ou nos seus familiares. Um aspecto clínico importante desses casos foi a apresentação de conjuntivite em 95% dos casos (CDC, 2003). Um caso fatal foi confirmado em uma veterinária holandesa que havia visitado uma das fazendas com casos de influenza aviária pelo A/H7N7. Em novembro de 2003 foi relatado um caso de influenza em um adulto de Nova York, associado ao subtipo de influenza aviária A/H7N2. Esse paciente apresentou sintomas de infecção de vias aéreas altas e baixas, sendo hospitalizado e apresentou recuperação completa (CDC, 2004). Ainda em 2003, durante o mês de dezembro foi confirmado um caso de infecção humana pelo vírus influenza A aviário/H9N2 em uma criança de cinco anos de idade, residente em Hong Kong. Após hospitalização a criança apresentou recuperação completa. A fonte desse caso humano não foi esclarecida (CDC, 2003).

Durante a estação 2003-2004 os subtipos de influenza A/H1, A/H3N2 e influenza B co-circularam em todo o mundo, com o predomínio do vírus influenza A (H3N2). Surtos de influenza aviária (em galinhas) causados pelo subtipo A/H5N1 foram relatados em países asiáticos. De janeiro a março de 2004 foram confirmados 34 casos de infecção grave humana por esse subtipo no Vietnã e na Tailândia. Cerca de 68% desses casos evoluíram para o óbito. Esses casos foram associados com surtos causados pelo subtipo A/H5N1 altamente

patogênico (CDC, 2004). Em março de 2004 foram relatados dois casos de influenza humana causados pelo subtipo de influenza A aviário/H7N3 em pessoas que trabalhavam em criadouros de galinhas no Canadá. Os dois pacientes evoluíram bem sem necessidade de hospitalização e com completa recuperação apesar desse subtipo ser considerado altamente patogênico.

Na estação de influenza de 2004-2005 houve a co-circulação dos subtipos de influenza A/H1, A/H3N2 e influenza B foram relatados em todo o mundo, com o predomínio do vírus influenza A/H3N2. Surtos de influenza aviária (em galinhas) pelo subtipo de influenza A/H5N1 foram relatados no Camboja, Tailândia e Vietnam. Esses surtos foram associados a casos humanos graves e fatais (CDC, 2005). De janeiro de 2004 a novembro de 2005 foram relatados 130 casos de influenza humana pelo subtipo A/H5N1 nos seguintes países Camboja, China, Indonésia, Tailândia e Vietnam. A evolução para o óbito ocorreu em 67 casos (WHO,2005).

Uma das justificativas para predominância do tipo A em relação ao B é que o tipo A tem maior capacidade de acumular mais rapidamente mutações pontuais, o que favorece o surgimento de pessoas susceptíveis a essas cepas que apresentam variações antigênicas ocasionando assim surtos e infecções mais graves em um menor espaço de tempo (SVS, 2004; BEBY-DEFAUX et al., 2003; RICHARD et al., 2000; SHEK & LEE, 2003).

No nosso estudo, algumas das amostras coletadas nos anos de 2003 e 2004, foram submetidas à caracterização da hemaglutinina viral por PCR. Em 47 amostras testadas, 39 foram positivas, sendo 37 do tipo A/H3 e 2 do tipo B. Apesar da caracterização da neuraminidase não ter sido feita, a literatura sugere tratar-se do subtipo viral influenza A/H3N2. Caso o vírus presente em Fortaleza seja realmente deste subtipo, então ambos os vírus encontrados nesta pesquisa estão comumente associados à necessidade de hospitalização entre crianças menores de quatro anos de idade (SANTOS et al., 1997). O subtipo de influenza A/H3N2 predominou em vários países sul-americanos como a Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Paraguai, Peru e Uruguai durante o período de outubro de 2003 a maio de 2004 (CDC, 2004). No período entre outubro de 2004 a maio de 2005 esse subtipo predominou nos seguintes países latino-americanos: Argentina, Brasil, Chile, República Dominicana, Peru, Santa Luzia e Venezuela (CDC, 2005).

Este subtipo viral emergiu na pandemia de 1968, denominada de influenza asiática (JONG, et al., 2000). Nos Estados Unidos, os casos de morte por pneumonia em decorrência de infecção pelo vírus influenza estão relacionados a este subtipo viral (HAYDEN & PALESE, 1997).

5.4 Co-infecção viral

Casos de infecções respiratórias com mais de um agente identificado têm sido relatados na literatura. Nesse estudo foram observados seis casos de co-infecção. Dois desses casos foram entre os dois tipos de vírus influenza e o restante entre influenza A ou B associado ao VSR. A co-infecção por influenza e VSR é relatada em alguns estudos (NUNES, 2004; IWANE et al; 2004; SOUZA et al, 2003) Os dois casos de co-infecção A e B não foram confirmados quando se realizou a PCR. Em um deles foi confirmada apenas a presença de influenza A, enquanto no outro a PCR foi totalmente negativa. A revisão da literatura quanto ao tema não mostrou nenhum caso de co-infecção semelhante. Um dos fatores que poderia contribuir para esse achado é o tipo de técnica empregada para seleção de casos positivos, no caso a RIFI, cujos resultados algumas vezes são citados como subjetivos. Vale a pena ressaltar que uma segunda RIFI poderia confirmar ou não esse achado, mas a mesma não foi feita pelo fato de não haver lâmina reserva disponível dessas amostras.

5.5 Sazonalidade

Vários fatos chamam a atenção quanto à sazonalidade das infecções por influenza nesse estudo. O primeiro deles é a maior ocorrência dessas infecções no primeiro semestre de cada ano, assim como foi observado para outras infecções virais e aquelas de etiologia não identificada. A ocorrência de casos esporádicos de influenza, sendo dois no mês de setembro de 2001 e três em julho de 2004, foi um fenômeno raro. Os períodos epidêmicos apresentaram duração que variou entre um e quatro meses. A época de surgimento dos primeiros casos também variou nos diferentes anos. Nos de 2002 e 2004 estes foram observados já em janeiro, enquanto que em 2001 e 2003 aconteceram em março e abril, respectivamente. O término de cada surto foi também registrado em meses diferentes, sendo mais precoce no ano de 2004, quando os últimos casos aconteceram em março. O surto mais tardio e mais curto foi registrado em 2003, onde os casos aconteceram apenas em abril.

Um segundo achado interessante desse estudo é a clara associação entre os períodos epidêmicos de influenza e a ocorrência de chuvas, o que ficou bem demonstrado pela correlação linear positiva significativa apresentada na figura 7. Em locais de clima tropical, que é o caso de Fortaleza, essa associação de chuvas aos períodos epidêmicos de influenza tem sido bem abordada (SHEK & LEE, 2003). Diferente do que acontece nas regiões de clima temperado, onde há uma variação ampla de temperatura no decorrer do ano, nos países de clima tropical os fatores mais variáveis são a umidade do ar e a ocorrência de chuvas. Em Fortaleza, a umidade relativa do ar é considerada alta, durante todo o ano, sendo em média de

70% e atingindo taxas de 85% a 90% na estação de chuvas. A relação dos surtos de influenza com fatores climáticos ocorre pelo fato de que em momentos como estes, as pessoas tendem a passar maior tempo em ambientes confinados, o que facilita a disseminação (BEBY-DEFAUX et al., 2003; LING et al., 2004; NICHOLSON et al., 2003; SHEK & LEE, 2003). Uma série de estudos confirma a associação dos surtos de influenza a ocorrência de chuvas. No Senegal, entre 1996 e 1998, o vírus teve pico máximo de isolamento nos meses de julho a setembro, período de maior pluviometria, umidade e temperatura (DOSSEH et al., 2000). Na Índia, de 1978 a 1990, 10 entre 16 surtos ocorreram durante o período de chuva, nos meses de junho a setembro (RAO & BANERJEE, 1993). Outros estudos realizados em regiões tropicais têm apresentado padrões diferentes de apresentação dos períodos epidêmicos de influenza. A ocorrência de mais de um pico de influenza , tanto pelo tipo A quanto B, foi relatada em um estudo realizado entre 1990 e 1994 em Singapura, sendo esses picos associados a ocorrência de chuvas (CHEW et al., 1998). A apresentação esporádica com número pequeno de casos foi observada em Hong Kong, entre 1985 e 1988 (SUNG et al., 1992). A presença de casos de influenza em diversos meses do ano, sem uma sazonalidade clara foi observada em Taiwan, de 1997 a 1999 (TSAI et al., 2001).

A associação de IRAs por influenza e a ocorrência de chuvas já havia sido descrita em um estudo de IRAs virais em crianças de uma comunidade carente de Fortaleza (ARRUDA et al,1991). Apesar de serem estudos realizados na mesma cidade, alguns aspectos podem analisados. Um deles é a apresentação de dois picos de infecção no mesmo ano, relatada por Arruda et al, 1991. O primeiro surto foi registrado nos meses de janeiro a maio de 1985, e o segundo entre novembro e dezembro desse mesmo ano. O primeiro surto ocorreu num período onde as chuvas ocorrem normalmente em Fortaleza. A ocorrência de chuvas no mês de dezembro, em Fortaleza é um fenômeno que pode acontecer em alguns anos, quando há uma antecipação da estação chuvosa. Em nenhum dos anos de estudo do nosso trabalho pode-se registrar um índice pluviométrico de cerca de 200mm em dezembro, como aconteceu no ano de 1985. Segundo, apesar de terem sido caracterizados como surtos de influenza, o número de casos dos dois estudos difere bastante. Enquanto o menor número de casos registrados por surto nesse estudo foi de 16 em 2003, o primeiro surto de influenza de 1985 foi de cinco casos e o segundo de seis, no total foram detectados 22 casos de influenza nos 29 meses de estudo. A regularidade da coleta de amostras do presente estudo assim como o número de amostras analisadas permitiu caracterizar mais claramente os surtos de influenza em Fortaleza.

O período de ocorrência de determinadas viroses no Brasil varia amplamente e isso pode ser devido à extensão territorial do país, sua diversidade geográfica e climática. A

revisão de estudos brasileiros sobre IRAs virais mostra que as infecções por influenza, assim como pelo VSR, podem ter variações inter e intra-regionais. Em Salvador, no ano de 1998, o vírus influenza foi detectado entre os meses de setembro e novembro (MOURA, 2001). Em Maceió, no ano de 2001, o vírus influenza A foi detectado durante todos os meses do ano, sendo sua maior atividade detectada nos meses de julho, setembro, outubro e dezembro (OLIVEIRA et al, 2004). Se compararmos os resultados desse estudo aos nossos veremos uma diferença temporal de ocorrência considerável dentro da região nordeste. Aproveitamos para lembrar que tanto em Salvador como em Maceió, os períodos de influenza, nos anos estudados não foram associados ao período de chuvas.

Vários estudos têm evidenciado diferenças intra-regionais, especialmente na região sudeste do Brasil. Em Vitória, o vírus influenza A apresentou uma maior incidência entre os meses de maio a agosto e o vírus influenza B foi detectado nos meses de julho, agosto, setembro, outubro e dezembro de 1999. Nessa mesma cidade, no ano 2001 esses vírus foram detectados apenas nos meses de outubro e novembro (LUGON, 2003). No Rio de Janeiro, durante quatro anos de estudo, não foi demonstrado nenhum padrão de sazonalidade claro, podendo ocorrer mais de uma vez por ano (NASCIMENTO et al, 1991). Em São Paulo os surtos de influenza ocorrem de uma forma mais relacionada aquela vista em cidades da região sul que a observada em outros estados do sudeste (PAIVA et al, 2000).

Em Porto Alegre, no ano de 1992, a maior freqüência de casos ocorreu durante os meses do segundo semestre nos meses de julho a setembro, associados ao período mais frio do ano (STRALIOTTO et al, 2002). Em São Paulo, Curitiba e Porto Alegre, em estudo realizado durante o período de 1996 a 1999, o vírus influenza A circulou entre março a setembro, com pico de junho a julho. O vírus influenza B co-circulou nestes estados, porém em período posterior a julho e se estendeu até o mês de novembro (PAIVA et al, 2000). Dados da ocorrência de influenza na região norte são escassos, apesar da localização de um dos centros de referência regional de influenza na cidade de Belém. Contudo há relato de que na cidade de Belém os casos de infecção pelo vírus influenza foram detectados durante todo o ano sem demonstrar um aumento de sua atividade (LUGON, 2003).

5.6 Características da população

A possibilidade de efetuar uma pesquisa deste tipo numa população infantil apresenta uma grande importância devido ao fato das crianças serem consideradas mais suscetíveis a gripe do que adultos (GLEZEN, 2000; SHEK & LEE, 2003) e serem consideradas

reservatórios naturais do vírus influenza, possuindo um papel central na disseminação do vírus (MUNOZ, 2003; OLIVIER, 2002). Por se tratar de um estudo onde a coleta de dados e amostras foi realizada durante 43 meses, nosso trabalho permitiu uma análise clara da epidemiologia do vírus influenza na população infantil atendida no HIAS.

Nossos resultados permitiram caracterizar melhor as infecções por influenza em crianças atendidas em diversos setores de um mesmo hospital. Uma característica marcante da população atendida no HIAS é que são crianças de famílias consideradas de baixa renda e que procuram esse hospital pelo mesmo prestar atendimento público gratuito de boa qualidade. Segundo os dados coletados, as famílias das crianças do estudo tinham baixo poder aquisitivo, com média salarial de 1,6 salário mínimo, sendo que até 75% da população ganhava até dois salários mínimos. Em outros países já foi demonstrado que problemas sócio-econômicos acabam exacerbando as consequências de infecções respiratórias (NICHOLSON et al., 2003). Normalmente o comprometimento nutricional e a baixa qualidade de saúde estão associados à situação de pobreza. As evidências apontam que, mediante estes fatores, a chance de disseminação do vírus é maior (KUSZEWSKI & BRYDAK, 2000; MANN et al., 1992; McCARTHY et al., 1992; SIMPSON et al., 1995). Normalmente, indivíduos nestas condições, recorrem ao atendimento hospitalar com problemas respiratórios apresentando quadros clínicos mais graves e, em alguns casos, sendo necessário a internação. Os comprometimentos respiratórios graves são bem mais freqüentes nesta parcela da população (JESSOP, 1996; van ROSSUM et al., 2000).

A maioria das crianças infectadas pelo vírus influenza recebeu a atenção médica nos ambulatórios e no setor de emergência, que em conjunto representaram 88.4% do local de atendimento, mostrando significância estatística ($p<0.0001$) quando comparada ao total de crianças atendidas nas enfermarias. Características semelhantes foram apresentadas em dois estudos brasileiros realizados nas cidades do Rio de Janeiro e Porto Alegre (NASCIMENTO et al, 1991; STRALIOTTO et al, 2002). Enquanto que nos dois estudos citados houve um predomínio significativo do atendimento ambulatorial em relação ao de emergência, os resultados do nosso estudo mostram uma pequena predominância do atendimento dessas crianças nos ambulatórios (48.7%) em relação ao atendimento prestado nas salas da emergência (39.7%), sem significância estatística. Alguns estudos reforçam a importância dos ambulatórios como locais para vigilância de influenza. Num amplo estudo com 6.986 crianças com sintomas de infecções respiratórias em Taiwan durante período de 1997 a 1999 mostrou-se que 8% dessa população apresentavam infecção por influenza e que 87% dessas crianças receberam atendimento ambulatorial (TSAI et al, 2001). A pesquisa de infecções respiratórias virais em crianças atendidas em ambulatórios da Finlândia mostrou que 18.8% dessas crianças

apresentavam infecções por influenza (HEIKKINEN et al, 2004). Isso certamente se relaciona ao tipo de apresentação clínica da doença, que na maioria das vezes é considerada leve, com sintomatologia que não justifica atendimento de emergência ou não têm indicação para internamento.

Cerca de 11,5% das crianças com infecção por vírus influenza receberam atendimento em enfermarias, representando 6% de toda a população atendida nesse setor. Esse número considerado pequeno quando comparado ao de atendimento em ambulatórios e emergência é o mais alto já relatado em estudos brasileiros. Um estudo realizado no Rio de Janeiro mostrou que o vírus influenza foi identificado em apenas uma das 551 crianças que foram hospitalizadas por IRA (NASCIMENTO et al, 1991). Achado semelhante foi observado entre crianças de Porto Alegre, segundo dados de um estudo onde duas entre 386 crianças hospitalizadas apresentaram infecção por esse vírus (STRALIOTTO et al, 2002).

O vírus sincicial respiratório (VSR) destaca-se como agente de IRA infantis que geram necessidade de hospitalização. Nesse estudo, o vírus influenza foi o segundo vírus, após o VSR, associado a casos de IRA de um modo geral e mais especificamente naquelas observadas em pacientes hospitalizados. Reconhece-se que na população idosa a influenza causa excesso de hospitalizações e aumento das taxas de mortalidade durante os períodos epidêmicos (LUI & KENDAL, 1987) o que não é referido comumente na população infantil (GLENZEN, 1980; MULLOOLY & BARKER, 1982). Uma série de estudos realizados recentemente tem demonstrado o impacto da influenza nas crianças. Crianças menores que cinco anos inclusive aquelas sem fator de risco conhecido apresentam taxas de hospitalização e complicações semelhantes às encontradas em adultos maiores de 65 anos (NEUZIL et al., 2000; IZURIETA et al., 2000). Entre crianças mexicanas e americanas hospitalizadas por infecção respiratória o vírus influenza foi o agente etiológico em 3,2% e 3,0% dos casos, respectivamente (NOYOLA et al., 2004; IWANE et al., 2004). Segundo um estudo realizado no Chile, durante o período epidêmico de influenza no ano de 2004, o vírus influenza foi o agente de 18% das IRAs em crianças hospitalizadas (VEGA-BRICENO et al., 2005). A maioria das crianças hospitalizadas do nosso estudo era de crianças previamente saudáveis, isso foi observado também entre crianças hospitalizadas com infecções por influenza. O impacto da influenza em crianças sem qualquer doença de base ou que possa ser incluída no grupo de risco para infecções respiratórias é bem observado em dois outros estudos que mostram que assim como no nosso estudo a maioria das crianças com influenza que foram hospitalizadas eram previamente sãs (SUGAYA et al., 2000; PETOLA et al., 2003). Somente dois pacientes hospitalizados eram considerados pacientes de risco para essa infecção, pois se tratavam de pacientes com cardiopatia congênita.e bronquiolite obliterante.

Como já foi discutida, a idade pode influenciar na evolução clínica da influenza. Nesse estudo 55,1% dos casos de influenza aconteceram em crianças até 24 meses e mais especificamente entre crianças entre 12 e 24 meses. Se compararmos, os resultados do nosso estudo com os de outro realizado com a mesma população, veremos que o vírus influenza infectou preferencialmente crianças com mais idade do que aquelas infectadas pelo VSR (NUNES et al., 2004). Pacientes que tinham acima de cinco anos representaram 17,3% dos casos. Segundo dados de estudos sobre influenza infantil realizado em Taiwan e na Finlândia, a maioria das crianças infectadas por influenza situa-se na faixa etária com idade igual ou superior a três anos (TSAI et al., 2001; PELTOLA et al., 2003). Alguns estudos demonstram que as hospitalizações por influenza nas crianças são mais freqüentes em crianças mais jovens, principalmente naquelas abaixo dos cinco anos de idade (WANG et al., 2003; TSAI et al., 2001; PELTOLA et al., 2003). No nosso estudo, observou-se que a maioria das crianças hospitalizadas com influenza situava-se na faixa etária entre 0 a 24 meses (88,9%). Os pacientes com influenza que tinham acima de cinco anos representaram 17,3% dos casos e nenhum deles foi hospitalizado.

As manifestações clínicas das infecções por vírus influenza variam de síndromes respiratórias leves a infecções respiratórias graves como pneumonia e suas complicações por infecção bacteriana secundária, como otite, sinusite e pneumonia. A maioria das infecções por influenza nesse estudo foi diagnosticada como IVAS (65,4%). Esse foi o diagnóstico clínico que predominou tanto em crianças atendidas no ambulatório como na emergência. Pacientes que apresentaram o diagnóstico de IVAS e que estavam internadas apresentaram infecção por influenza durante hospitalização por outra causa. Nesse caso situaram-se um paciente que ia ser submetido a intervenção cirúrgica para tratamento de cardiopatia congênita e outro internado por bronquiolite obliterante. Entre os 54 pacientes internados com infecção pelo vírus influenza (90,7%) apresentaram IVAI. O diagnóstico de IVAI correspondeu a 22,3% e 38,7% daqueles feitos no ambulatório e na emergência, respectivamente. As IVAI ocorreram mais freqüentemente em crianças até dois anos de idade enquanto as IVAS foram mais freqüentes em crianças maiores de um ano de idade.

Com relação à ocorrência de influenza segundo o sexo da população estudada não houve diferença estatística significante, como tem sido relatado em outros estudos (OLIVEIRA et al, 2004; PLOIN et al, 2003; PELTOLA et al, 2003). No entanto um estudo realizado com crianças coreanas mostrou uma associação maior entre influenza e o sexo masculino, com uma proporção de 2,3 meninos para 1 menina (KIM et al., 2000).

5.7 Vacinação

A vacinação contra a gripe tem sido preocupação constante da OMS. Esta assume a responsabilidade de estabelecer uma rede internacional que mantém a vigilância epidemiológica e recomenda a formulação da vacina. A princípio a recomendação da vacina ocorria apenas uma vez ao ano, porém, alguns países do Hemisfério Sul, como a Austrália e a Nova Zelândia não seguiam estas recomendações, estabelecendo sua própria formulação. A partir de então a formulação passou a ocorrer em dois momentos, um para o hemisfério norte e outra para o hemisfério sul. A OMS determinou o hemisfério austral, local onde, o inverno começa em junho (FORLEO-NETO et al., 2003; LAYNE et al., 2001). No primeiro semestre de 1999, o Ministério da Saúde do Brasil iniciou a vacinação contra influenza, tendo como população-alvo os maiores de 65 anos. A partir de 2000, ampliou-se a população alvo da vacinação, incluindo-se os maiores de 60 anos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). . Essa vacinação é realizada em campanhas anuais em todos o território nacional. O período adotado pelo Ministério da Saúde do Brasil para realização das campanhas de vacinação é baseado na recomendação feita pela OMS para os países do hemisfério sul.

Em muitos países a imunização é utilizada como forma de prevenir a morbi-mortalidade, principalmente entre os grupos de alto-risco. A efetividade da vacina já é claramente conhecida (CARRAT et al., 1998). Alguns estudos demonstraram o impacto positivo da vacinação contra a gripe na prevenção de internações e mortes por pneumonias e outras doenças, tanto em idosos saudáveis como em população de risco, particularmente nos períodos de maior circulação do vírus (CDC, 2000; NICHOLSON et al., 1997).

Um dos resultados mais significativos do nosso estudo foi a caracterização dos períodos de ocorrência de influenza em Fortaleza. No ano de 2001, as campanhas de vacinação antecederam em apenas um mês o pico de influenza, nos anos seguintes os picos de infecção ocorreram no mês de imunização ou a antecederam. Torna-se questionável o período adotado para tais campanhas em nossa cidade. Qual a eficiência desse método tendo em vista o período de sua realização? Quais as futuras estratégias para que tais campanhas sejam efetivas em nossa cidade? Seria coerente repensar no período de campanhas tendo em vista a diversidade temporal de ocorrência dos surtos no Brasil? Poderia ser adotada mais de uma campanha de vacinação por ano, respeitando-se tamanhas diversidades? O fato do Ministério da Saúde utilizar como modelo para aplicação nacional o padrão de sazonalidade dos estados do sul e sudeste (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003) e a inexistência (ou falta de divulgação) dessas informações no restante do país, resulta em um modelo ineficiente. Soluções para esse problema podem surgir de sistemas de vigilância abrangentes, como o

realizado desde 2000 pelo Ministério da Saúde ou pelo desenvolvimento de pesquisas como a nossa.

A utilização da vacina nos idosos previne a ocorrência das formas graves da infecção, mas não previne de fato o surto no resto da população adulta e infantil (GUTIERREZ et al., 2001). No Brasil, as campanhas estão voltadas somente para o idoso e é distribuída de forma gratuita. Os custos com a vacina ainda são muito elevados para o país. Estão sendo efetuadas pesquisas para ampliação da produção de vacina e diminuição dos seus custos (KEMBLE & GREENBERG, 2003; AULT, 2004).

As crianças são os vetores da doença e continuam expostas à infecção. Alguns estudos já demonstraram que há uma real necessidade de imunização, inclusive com recomendações em alguns países, como Estados Unidos e Japão, para que se faça a imunização de crianças com mais de seis meses de idade. Isto levaria a uma diminuição dos casos de gripe, bem como, de suas complicações, mais freqüentes nesta faixa etária, incluindo casos fatais e também evitando a disseminação viral na comunidade (GLEZEN, 2000; MUÑOZ, 2002).

Para as crianças com menos de seis meses de idade ainda não se tem nenhuma vacina licenciada disponível. No entanto, a imunização da mãe no terceiro trimestre da gravidez pode promover uma alta concentração de anticorpos protetores que após o nascimento protege a crianças contra infecções graves. Além disso, a gripe no final da gravidez pode se tornar grave devido às alterações fisiológicas que a gravidez causa no sistema imunológico e respiratório (NEUZIL et al., 1998). A imunização protege tanto a mãe quanto o feto (GALL, 2001) e também não gera qualquer risco ao aleitamento materno (MUÑOZ, 2003).

5.8 Técnicas de diagnóstico

Os aspirados de nasofaringe foram escolhidos por serem uma amostra clínica adequada para a realização das técnicas utilizadas nesse estudo. A técnica de coleta da amostra é rápida e pouco traumática para o paciente (AHLUWALIA et al., 1987), além disso, é obtida uma grande quantidade de células infectadas (TAUBENBERGER & LAYNE, 2001). O método de diagnóstico de triagem para pesquisa de vírus respiratórios, entre eles os vírus influenza A e B foi a RIFI. Através desse método 154 amostras foram consideradas positivas para esses vírus. Esta técnica é considerada rápida e, além disso, apresenta sensibilidade e especificidade semelhantes à cultura de células, também apresentando uma sensibilidade superior quando comparada ao ELISA (HALONEN et al., 1996; PIEDRA et al., 1997; SIQUEIRA et al., 1986; TRISTAM & WELLIVER, 1995). Cerca de 4 a 13% as lâminas podem exibir fluorescência inespecífica (SHEN et al., 1996), este problema varia de acordo com a experiência do microscopista e com a qualidade dos reagentes utilizados. A maioria dos

estudos citados nesse trabalho utiliza essa mesma técnica para diagnóstico das infecções por influenza (VIEGAS et al., 2004; CHEW, et al., 1998; SHEN et al., 1996; HAZLETT et al., 1988; SUNAKORN et al., 1990). O sistema de vigilância nacional de influenza, em suas 31 unidades sentinelas emprega esse método e o mesmo kit empregado no nosso estudo.

Para a análise de hemaglutinina dos vírus isolados, foi adotada a técnica de detecção genômica RT-PCR multiplex. Este procedimento é amplamente utilizado nos centros especializados em vigilância epidemiológica do vírus, sendo recomendado pela OMS por apresentar uma alta sensibilidade e especificidade, chegando a apresentar uma sensibilidade mil vezes maior que a cultura de células e um milhão de vezes maior que o ELISA (ELLIS et al., 1997; HUNGNES, 2002; TAUBENBERGER & LAYNE, 2001; GAVIN et al., 2003).

Um total de 47 amostras que positivas para influenza por RIFI foi também submetido à PCR, para avaliar o índice de concordância de resultados entre os métodos. Oito amostras positivas por RIFI não resultaram positivas na PCR, o que representa um percentual de 17%. Alguns estudos relatam uma variação entre 23,7% a 1,7% entre estas técnicas, utilizando SNF (EUGÈNE-RUELLAN et al., 1998; VAN MILAAN et al., 1994). Um estudo com amostras de SNF da cidade de Vitória, que empregou essas duas técnicas em 16 amostras, mostrou que 18,2% das amostras positivas por RIFI não tiveram sua positividade confirmada por PCR (LUGON, 2003).

Ressaltamos que a utilização da PCR-multiplex nesse estudo serviu para constatar a alta freqüência do vírus do tipo A/H3 em co-circulação com o vírus influenza B nos anos de 2003 e 2004.

5.9 Considerações finais

O contingente de pacientes analisados, referente à demanda ao serviço médico do HIAS, nos quatro anos de estudo é representativo. Em relação ao número de pacientes incluídos, ao número de pacientes infectados por influenza, ao período de estudo pode-se considerar esse trabalho como o mais abrangente, respeitando o tipo de população de estudo, no Brasil. A vigilância da gripe realizada no pelo Ministério de Saúde do Brasil possibilitará que dados mais representativos sejam conhecidos em curto prazo, uma vez que desde 2000 esse trabalho vem sendo realizado e as expectativas são de que o sistema inclua outros estados.

O Brasil tem demonstrado esforços frente à comunidade internacional de conter os surtos pelo vírus influenza. Porém, em virtude das características peculiares da gripe, as

medidas de prevenção e controle sustentam a necessidade, em nível local, da caracterização sistemática das cepas virais dos vírus influenza circulantes em Fortaleza, da reavaliação do programa de imunização, bem como a realização de estudos clínico-epidemiológicos. Estes últimos visando aferir a morbi-mortalidade inerente ao vírus, uma vez que não se sabe como se comportarão os futuros surtos da influenza em relação a sua extensão e gravidade clínica.

6. CONCLUSÕES

- A prevalência de infecções pelo vírus influenza na população estudada foi de 8%. Essas infecções foram a segunda mais prevalente entre as infecções virais identificadas 24,1%;
- O vírus influenza apresenta, em Fortaleza, um padrão de ocorrência anual regular, observado durante o primeiro semestre de cada ano, correlacionado ao período chuvoso;
- Os períodos epidêmicos de influenza em Fortaleza antecederam ou ocorreram concomitantemente as campanhas nacionais de vacinação;
- Os vírus influenza A (somente a variante A/H3) e B co-circularam em todos os anos de estudo, havendo uma predominância significativa do vírus influenza A em relação ao vírus influenza B;
- Crianças com infecções por vírus influenza foram atendidas predominantemente nos ambulatórios e na emergência;
- Cerca de 11.5% das crianças com infecção por vírus influenza foram hospitalizadas, a maioria delas apresentando infecções de vias aéreas inferiores;
- A influenza foi detectada em todas as faixas etárias, mas predominou em crianças até os dois anos de idade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. Imunidade contra micróbios. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. (Ed.) **Imunologia Celular & Molecular**. 3^a Ed. Revinter, 2000, p. 359.
- AHLUWALIA, G.; EMBREE, J.; McNICOL, P.; LAW, B.; HAMMOND, G. W. Comparison of nasopharyngeal aspirate and nasopharyngeal swab specimens for respiratory syncytial virus diagnosis by cell culture, indirect immunofluorescence assay and enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 5, p. 763-767, 1987.
- ARRUDA, E.; HAYDEN, F. G.; McAULIFFE, J. F.; DE SOUSA, M. A.; MOTA, S. B.; McAULIFFE, M. I.; GEIST, F. C.; CARVALHO, E. P.; FERNANDES, M. C.; GUERRANT, R. L.; GWALTNEY JR., J. M. Acute respiratory viral infections in ambulatory children of urban northeast Brazil. **Journal of Infectious Disease**, v. 164, n. 2, p. 252-258, 1991.
- AULT, A. Shifting Tactics in the Battle Against Influenza. **Science**, v. 303, n. 5662, p. 1280, 2004.
- AYMARD, M.; VALETTE, M.; LINA, B.; THOUVENOT, D. Surveillance and impact of influenza in Europe. **Vaccine**, v. 17, supl.1, p. S20-S41, 1999.
- BEARE, A.S.; WEBSTER, R.G. Replication of avian influenza viruses in humans. **Archives of Virology**, v. 119, n. 1-2, p.37-42, 1991.
- BEBY-DEFAUX, A.; GIRAudeau, G.; BOUGUERMOUH, S.; AGIUS, G. La grippe humaine: aspects virologiques, épidémiologie et diagnostic virologique. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 33, n.3, p. 134-142, 2003.
- BELSHE, R. B.; MENDELMAN, P. M.; TREANOR, J. The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children. **The New England Journal of Medicine**, v. 338, n.20, p. 1405-1412, 1998.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E.; VAN der NOORDAA, J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, v.28, n.3, p. 495-503, 1990.
- BOYCE, T. G. Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults. **Vaccine**, v. 19, n. 23, p. 217-226, 2000.
- BRIDGES C. B. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 51, n. RR-3, p. 1-31, 2002.
- BUONAGURIO, D. A.; NAKADA, S.; DESSELBERGER, U.; KRYSTAL, M.; PALESE, P. Non cumulative sequence changes in the hemagglutinin genes of influenza C virus isolates. **Virology**, v. 146, p. 221-232, 1985.
- CARRAT, F.; TACHET, A.; CHRISTINE, R.; HOUSSET, B.; VALLERON, A. Field investigation of influenza vaccine effectiveness on morbidity. **Vaccine**, v. 16, n. 9/10, 1998.

CDC. Prevention and Control of influenza: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 49, n. RR03, p. 1-38, 2000.

CDC. Influenza Activity – United States and Worldwide 2001-02 season and composition of the 2002-03 influenza vaccine. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 51, p. 503-506, 2002.

CDC. Influenza Activity – United States and Worldwide 2002-03 season and composition of the 2003-04 influenza vaccine. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 52, p. 516-520, 2003.

CDC. Influenza Activity – United States and Worldwide 2003-04 season and composition of the 2004-05 influenza vaccine. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 53, p. 547-551, 2004.

CDC. Influenza Activity – United States and Worldwide, 2004-05 season. **Morbidity Mortality Weekly Report**, v. 54, p. 631-634, 2005.

CLAAS, E. C. J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; VAN BECK, R. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. **The Lancet**, v. 351, n.9101, p. 472-477, 1998.

CHAKRAVERTY, P.; CUNNINGHAM, P.; SHEN, G. Z.; PEREIRA, M. S. Influenza in the United Kingdom, 1982-1985. **Journal of Hygiene**, v. 97, n. 2, p. 347-358, 1986.

CHAN, K. H.; MAILDEIS, N.; POPE, W.; YUP, A.; OZINSKAS, A.; GILL, J.; SETO, W. H.; SHORTRIDGE, K. F.; PEIRIS, J. S. M. Evaluation of the Directigen Flu A+B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1675-1680, 2002.

CHEN, W.; NI, H.; HUANG, P.; ZHOU, H.; LIU, S. Surveillance of influenza viruses in Guandong Pronvince, China in 1998: a preliminary report. **International Congress Series**, v. 1219, p. 123-129, 2001.

CHEW, F. T.; DORAISINGHAM, S.; LING, A. E.; KUMARASINGHE, G.; LEE, B. W. Seasonal trends onf viral respiratory tract infections in the tropics. **Epidemiology of Infections**, v. 121, n.1, p. 121-128, 1998.

CONNOLLY, A. M.; SALMON, R. L.; WILLIAMS, D. H. What are the complications of influenza and can they be prevent? **British Medical Journal**, v. 306, n.6890, p. 1452-1454, 1993.

COUCEIRO, J. N. S. S. Viroses Respiratórias. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. (Ed.). **Introdução à Virologia Humana**. Editora Guanabara Koogan S. A., 2002. p. 119-125.

COVALCIUC, K. A.; WEBB, K. H.; CARLSON, C. A. Comparison of four clinical specimen types for detection of influenza A and B viruses by optical immunoassay (FLU OIA test) and cell culture methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 12, p. 3971-3974, 1999.

- COX, N. J.; TAMBLYN, S. E.; TAM, T. Influenza pandemic planning. **Vaccine**, v. 21, n.16, p. 1801-1803, 2003.
- COX, N. J.; SUBBARAO, K. Influenza. **The Lancet**, v. 345, n.8960, p. 1277-1782, 1999.
- DAISY, J. A.; LIEF, F. S.; FRIEDMAN, H. M. Rapid diagnosis of influenza A infection by direct immunofluorescence of nasopharyngeal aspirates in adults. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 688-692, 1979.
- DOING K. M.; JERKOFSKY, M. A.; DOW E. G.; JELLISON, J. A. Use of fluorescent antibody staining of cytocentrifuge-prepared smears in combination with cell culture for direct detection of respiratory viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 2112-2114, 1998.
- DOLIN, R.; REICHMAN, R. C.; MADORE, H. P. A controlled trial od amantadine and rimantadine in the prophylaxis of influenza A infectinon. **The New England Journal of Medicine**, v. 307, n.10, p. 580-584, 1982.
- DONALISIO, M. R.; RAMALHEIRA, R. M.; CORDEIRO, R. Eventos adversos após vacinação contra influenza em idosos, Distrito de Campinas, SP, 2000. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 4, p. 467-471, 2003.
- DOSSEH, A.; NDIAYE, K.; SPIEGEL, A.; SAGNA, M.; MATHIOT, C. Epidemiological and virological influenza survey un Dakar, Senegal. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 62, n.5, p. 639-643, 2000.
- ELLIS, J. S.; FLEMING, D. M.; ZAMBON, M. C. Multiplex Reverse Transcription-PCR for Surveillance of Influenza A and B Viruses in England and Wales in 1995 and 1996. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 8, p. 2076-2082, 1997.
- EUGÈNE-RUELLAN, G.; FREYMUTH, F.; BAHLOUL C.; BADRANE, H.; VABRET, A.; TORDO, N. Detection od respiratory syncytial virus A and B, and parainfluenzavirus 3 sequences in respiratory tract of infants by a single PCR with primers targeted to the L-polymerase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n.3, p. 796-801, 1998.
- FAN, J.; HENDRICKSON, K. J.; SAVATSKI, L. L. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and b, influenza A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2 and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction- enzyme hybridization assay (hexaplex). **Clinical Infectious Diseases**, v. 26, n.6, p. 1398-1402, 1998.
- FARHAT, C. K.; CINTRA, O. A. L.; TREGNAGHI, M. W. Vacinas e o trato respiratório – o que devemos saber? **Jornal de Pediatria**, v. 78, supl. 2. p. S195-S204, 2002.
- FITCH, W. M.; BUSH, R. M.; BENDER, C. A.; COX, N. J. Long-term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n.15, p. 7712-7718, 1997.
- FORLEO-NETO, E.; HALKER, E.; SANTOS, V. J.; PAIVA, T. M.; TONILO-NETO, J. Influenza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2. p. 267-274, 2003.

FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA. **Monitoramento.** Disponível em: <<http://www.funceme.br>>, Acesso em: 01 abr. 2005.

GALBRAITH, A. W.; OXFORD, J. S.; SCHILD, G. L. Protective effect of 1-adamantanamine hydrochloride on influenza A2 infections in the family environment, a controlled double-blind study. **The Lancet**, v. 294, n.7629, p. 1026-1028, 1969.

GALL, S. A. Influenza and current guidelines for its control. **Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology**, v. 9, n.4, p. 193-195, 2001.

GARDNER, P. S.; McQUILLIN, J. **Rapid virus diagnosis:** application of immunofluorescence. 2. ed. London: Butterworth, 1980. 317p;

GAVIN, P. J.; THOMSON, R. B. Review of Rapid Diagnostic Tests for Influenza. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, v. 4, n.3, p. 151-172, 2003.

GLEZEN, W. P. Considerations of the risk of influenza in children and indications for prophylaxis. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 2, p. 408-420, 1980.

GLEZEN, W. P. Emerging infections: pandemic influenza. **Epidemiologic Reviews**, v. 18, n.1, p. 65-67, 1996.

GLEZEN, W. P.; COUCH, W. P. Influenza viruses. In: EVANS, A. S. (Ed.). **Viral Infections of Humans: epidemiology and Control.** 3^a ed. New York: Plenum, 1989, p. 419.

GLEZEN, W. F. Prévention de la grippe chez les enfants. **Archives de Pédiatrie**, v. 7, n.10, p. 1037-1038, 2000.

GLUECK, R. Pre-clinical and clinical investigation of safety of a novel adjuvant for intranasal immunization. **Vaccine**, v. 20, supl. 1, p. S42-S-44, 2001.

GREGG, M. B.; HINMAN, A. R.; CRAVEN, R. B. The Russian flu. Its history and implications for this year's influenza a season. **The Journal of the American Medical Association**, v. 240, n 21, p. 2260-2263, 1978.

GREGORY, V.; BENNETT, M.; ORKHAN, M. H. Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses during 2001. **Virology**, v. 300, n.1, p. 1-7, 2001.

GUTIERREZ, E. B.; LI, H. Y.; SANTOS, A. C. S.; LOPES, M. H. Effectiveness of influenza vaccination in elderly outpatients in São Paulo city Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de S. Paulo**, v. 43, n. 6, p. 317-320, 2001.

HAK, E.; van LOON, S.; BUSKENS, E.; van ESSEN G. A.; de BAKKER, D.; TACKEN, M. A. J. B.; van HOUT, B. A.; GROBEE, D. E.; VERHEIJ, Th. J. M. Design of the Dutch Prevention of Influenza, Surveillance and Management (PRISMA) study. **Vaccine**, v. 21, n.15, p. 1719-1724, 2003.

HALONEN, P.; HERHOLZER, J.; ZIEGLER, T. Advances in the diagnosis of respiratory virus infections. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 5, n. 2-3, p. 91-100, 1996.

HAY, A. J. The mechanism of action of amantadine and rimantadine against influenza viruses. In: **Concepts in viral pathogenesis III**: Springer, 1989. p. 561-567.

HAYDEN, F. G.; ATMAR, R. L.; SCHILLING, M. Use of the selective oral neuraminidase inhibitor osealtamivir to prevent influenza. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n.18, p. 1336-1343, 1999.

HAYDEN & PALESE. Influenza Virus. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. (Ed.). **Clinical Virology**. 1a Ed Amer, 1997. p. 911-942.

HAZLETT, D. T. G.; BELL, T. M.; TUKEI, P. M.; ADEMBA, G. R.; OCHIENG, W. O.; MAGANA, J. M.; GATHARA, G. W.; WAFULA, E. M.; PAMBA, A.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; SIONGOK, T. K. Viral etiology and epidemiology of acute respiratory infections in children in Nairobi, Kenya. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 39, n. 6, p. 632-640, 1988.

HEHME, N. Pandemic preparedness: lessons learnt from H2N2 and H9N2 candidate vaccines. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 191, n. 3-4, p. 203-208, 2002.

HEIKKINEN, T.; SILVENNOINEN, H.; REUNANEN, T.; ZIEGLER, T.; VAINIONPÄÄ, R. Illness symptoms and absences due to influenza in different age groups of children. **International Congress Series**, v. 1263, p. 101-104, 2004.

HEINEN, P. P.; RIJSEWIJK, F.A.; DE BOER-LUIJTE; BIANCHI, A.T. Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2-nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. **Journal of General Virology**, v. 83, N. Pt 8, p. 1851-1859, 2002.

HILLEMAN, M. R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. **Vaccine**, v. 20, n.25-26, p. 3068-3087, 2002.

HINDIYEH, M.; GOULDING C.; MORGAN, H.; KENYON, B.; LANGER, J.; FOX, L.; DEAN, G.; WOOLSTENHULME, D.; TURNBOW, A.; BILLETDEAUX, E.; SHAKIB, S.; GORDON, C.; POWERS, A.; VARDENY, G.; JOHNSON, M.; SKODACK-JONES, L.; CARROLL, K. Evaluation of Biostar FLU OIA assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. **Journal of Clinical Virology**, v. 17, n.2, p. 119-126, 2000.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by influenza A viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.1, p.129-149, 2001.

HUNGNESS, O. The role of genetic analysis in influenza virus surveillance and strain characterisation. **Vaccine**, v. 20, supl.5, p. B45-B49, 2002.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Informe Técnico – Campanha Nacional de Vacinação para Idosos – 2003**. Disponível em: <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>>, acesso em 30 mai. 2005.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Estimativas Populacionais para os municípios brasileiros em 01/07/2004**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>, acesso em 30 mai. 2005.

ITO, T.; COUCEIRO, J. N. S. S.; KELM, S.; BAUM, L. G.; KRAUS, S.; CASTRUCCI, M. C. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **Journal of Virology**, v. 72, n.9, p. 7367-7373, 1998.

IWANE, M. K.; EDWARDS, K. M; SZILAGYI, P. G.; WALKER, F. J.; GRIFFIN, M. R.; WEINBERG, G. A.; COULEN, C.; POEHLING, K. A.; SHONE, L. P.; BALTER, S.; HALL, C. B. ERDMAN, D. D.; WOOTEN, K.; SCHWARTZ, B. Population-Based Surveillance for Hospitalizations associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and parainfluenza viruses among young children, **Pediatrics**, v. 113, n. 6, p. 1758-64, 2004.

IZURIETA, H. S.; THOMPSON, W. W.; KRAMARZ, P. Influenza and the rates of hospitalization for respiratory disease among infants and young children. **The New England Journal of Medicine**, v. 342, n.4, p. 232-239, 2000.

JESSOP, E. G. Deprivation and mortality in non-metropolitan areas of England and Wales. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 50, n. 5, p. 524-526, 1996.

JONG, J. C.; RIMMELZWAAN, G. F.; FOUCHIER, R. A. M.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Influenza Virus: a Master of Metamorphosis. **Journal of Infection**, v. 40, n. 3, p. 218-228, 2000.

KAISER, L.; BRIONES, M. S.; HAYDEN, F. G. Performance of virus isolation and Directigen Flu A to detect influenza A virus in experimental human infection. **Journal of Clinical Virology**, v.14, n.3, p. 191-197, 1999.

KASE, T.; MORIKAWA, S.; OKUNO, Y.; MAEDA A.; BABA, K. Reinfection with antigenically similar influenza virus observed at a pediatric clinic in Osaka from December 1998 to April 2002. **International Congress Series**, v. 1263, p. 304-307, 2004.

KEMBLE, G.; GREENBERG, H. Novel generations of influenza vaccines, **Vaccine**, v. 21, n.16, p. 1789-1795, 2003.

KIM, M. R.; LEE, H. L.; LEE, G. M. Epidemiology of Acute Viral Respiratory Tract Infections in Korean Children. **Journal of Infection**, v. 41, n.2, p. 152-158, 2000.

KITLER, M. E.; GAVINIO, P.; LAVANCHY, D. Influenza and the work of the World Health Organization. **Vaccine**, v. 20, supl.2, p. s5-s14, 2002.

KUSZEWSKI K.; BRYDAK, L. The epidemiology and history of influenza. **Biomed & Pharmacother**, v. 54, n.4, p. 188-195, 2000.

LAVER, G.; GARMAN, E. The Origin and Control of Pandemic Influenza, **Science**, v. 293, n.5536, p. 1776-1777, 2001.

LAYNE, S. P.; BEUGELSDIJK, T. J.; PATEL, C. K. N.; TAUBENBERGER, J. K.; COX, N. J.; GUST, I. D.; HAY, A. J.; TASHIRO, M.; LAVANCHY, D. A Global Lab Against Influenza. **Science**, v. 293, n.5536, p.1729, 2001.

LEONARDI, G. P.; LEIB, H.; BIRKHEAD, G. S.; SMITH, C.; COSTELLO, P.; CONRON, W. Comparison of rapid detection methods for influenza A virus and their value in health-care management of institutionalized geriatric patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 70-74, 1994.

(a) LIN, Y. P.; GREGORY, V.; BENNETT, M.; HAY, A. Recent changes among influenza viruses. **Virus Research**, v. 103, n. 1-2, p. 47-52, 2004.

(b) LIN, T. Y.; HUANG, y. C.; NING, H. C.; TSAO, K. C. Surveillance of respiratory viral infections among pediatric outpatients in northern Taiwan. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 1, p. 81-85, 2004.

LING, A. E.; HAMPSON, A. W.; JENNINGS, L. S.; TAM, J. S. Seasonality and influenza virus strains for vaccines in the Asia-Pacific region. **International Congress Series**, v. 1263, p. 426-429, 2004.

LIU, M.; HE, S.; WALKER, D.; ZHOU, N.; PEREZ, D. R.; MO, B.; LI, F.; HUANG, X.; WEBSTER, R. G.; WEBBY, R. J. The Influenza Virus Gene Pool in a Poultry Market in South Central China. **Virology**, v. 305, n.2, p. 267-275, 2003.

LOGAR, M. Microbial aetiology of community-acquired pneumonia in hospitalised patients. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 18, n.11, p. 777-782, 1999.

LUGON, A. K. **Caracterização genômica e sazonalidade do vírus influenza na população da região metropolitana de Vitória, ES de 1999-2001**. 2003. 115 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Laboratório de Vírus Respiratório do Departamento de Virologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2003.

LUI K.J.; KENDAL, A. P. Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. **American Journal of Public Health**. v. 77, n. 6, p. 712-716, 1987.

MACKIE, P, L. The Classification of viruses infecting the respiratory tract. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 4, n. 2, p. 84-90, 2003.

MANN, S. L.; WADSWORTH, M. E. J.; COLLEY, J. R. T. Accumulation of factors influencing respiratory illness in members of a national birth cohort and their offspring. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 46, n. 3, p. 286-292, 1992.

MANUGUERRA, J. C. Écologie, biodiversité et évolution dês vírus gripaux. **Virologie**, v. 5, n.1, p. 195-205, 2001.

MANUGUERRA, J. C. Grippe. In: **Encyclopédie Médico-Chirurgicale. Maladies Infectieuse**. Éditions scientifiques et médicales Elsevier, p. 1-22, 2002.

MARTINS, L. C.; LATORRE, M. R. D. O.; CARDOSO, M. R. A.; GONÇALVES, F. L. T.; SALDIVA, P. H. N.; BRAGA, A. L. F. Poluição atmosférica e atendimentos por pneumonia e gripe em São Paulo, Brasil. **Revista da Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 88-94, 2002.

McCARTHY, P.; BYRNE, D.; HARRISON, S.; KEITHLEY, J. Respiratory conditions: effects of housing and other factors. **Social Psychiatry**, v. 20, n. 3, p. 125-30, 1985.

McCLELLAN, K.; PERRY, C. M. Oseltamivir: a review of its use in influenza. **Drugs**, v. 61, n.2, p. 263-283, 2001.

McQUILLIN, J.; MADELEY, C. R.; KENDAL, A. P. Monoclonal antibodies for the rapid diagnosis of influeza A and B virus infections by immunoflorescence. **The Lancet**, v. 326, n.8461, p. 911-914, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Programa de Saúde do Idoso.** Disponível em: <<http://saude.gov.br/programas/idoso/programa.num>>, acesso em 30 mai. 2005.

MONTO, A. S.; GUNN, R. A.; BANDYK, M. G. Prevention of Russian influenza by amantadine. **The Journal of the American Medical Association**, v. 241, n.10, p. 1003-1007, 1979.

MONTO, A. S.; ROBINSON, D. P.; HERLOCHER, M. L.; HINSON, J. M.; ELLIOTT, M. J.; CRISP, A. Zanamivir in the prevention of influenza among health adults: a randomized controlled trial. **The Journal of the American Medical Association**, v. 282, n.1, p. 31-35, 1999.

MOTTA, F. C.; LUIZ, M. O.; COUCEIRO, J. N. S. S. Serological analysis reveals circulation of influenza C viruses, Brazil. **Revista da Saúde Pública**, v. 34, n. 2, p. 204-205, 2000.

MOURA, F. E. A. **Infecções respiratórias agudas virais em crianças de Salvador:** caracterização antigênica e genômica dos vírus sincicial respiratório e adenovírus isolados e correlação clínico-epidemiológica. 2001. 196p. Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

MOURA, F. E. A.; BORGES, L. C.; SOUZA, L. S. F.; RIBEIRO, D. H.; SIQUEIRA, M. M.; RAMOS, E. A. G. Estudo de infecções respiratórias agudas virais em crianças atendidas em um centro pediátrico em Salvador (BA). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 275-282, 2003.

MULLOLY, J. P.; BARKER, W. H. Impact of type A influenza on children: a retrospective study. **American Journal of Public Health**, v. 72, n.9, p. 1008-1016, 1982.

MUNOZ, F. M. The impact of Influenza in Children. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 72-78, 2002.

MUNOZ, F. M. Influenza virus infection in infancy and early childhood. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 4, n.2, p. 99-104, 2003.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. Ortomixovírus. In: MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; KOBAYASHI, G. S.; PFALLER, M. A. (Ed.). **Microbiologia médica**. 3^a Ed. Guanabara Koogan, 2000. p. 392-397.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. B. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1397-1445.

NAGHAVI, N.; BARLAS, Z.; SIADATA, S.; NAGUIB, S.; MAJID, M.; CASSCELLS, W. Association of influenza vaccination and reduced risk of recurrent myocardial infarction. **Circulation**, v. 102, n. 25, p. 3039-3045, 2000.

NASCIMENTO, J. P.; SIQUEIRA, M. M.; SUTMÖLLER, F.; KRAWCZUK, M. M.; FARÍAS, V.; FERREIRA, V.; RODRIGUES, M. J. Longitudinal study of acute respiratory disease in Rio de Janeiro: Occurrence of respiratory viruses during four consecutive years. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 4, p. 287-296, 1991.

NASH, T. Imunidade aos vírus. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. 5^a Ed. Editora Manole, 1999. p. 221-228.

NEGRI, E.; COLOMBO, C.; GIORDANO, L.; GROTH, N.; APOLONE, G.; VECCHIA, C. L. Influenza vaccine in healthy children: a meta-analysis. **Vaccine**, v. 23, n.22, p. 2851-2861, 2004.

NEIRYNCK, S. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. **Nature Medicine**, v. 5, n. 10, p. 1157-1163, 1999.

NEUZIL, K. M.; REED, G. W.; MITCHEL, E. F. SIMONSEM L, GRIFFIN M. R. Impact of influenza on acute cardiopulmonary hospitalizations in pregnant women. **American Journal of Epidemiology**, v. 148, n.11, p. 1094-1102, 1998.

NEUZIL, K. M.; WRIGHT, P. F.; MITCHEL, E. F. Jr.; GRIFFIN, M. R. The burden of influenza illness in children with asthma and other chronic medical conditions. **Journal of Pediatrics**, v. 137, n. 6, p. 856-864, 2000.

NICHOL, K. L.; MARGOLIS, K. L.; WUORENMA, J.; VON STERNBERG, T. The efficacy and cost-effectiveness of vaccination against influenza among elderly persons in the community. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n.12, p. 778-784, 1994.

NICHOLSON, K. G.; KENT, J.; HAMMERSLEY, V.; CANCIO, E. Acute viral infections of upper respiratory tract in elderly people living in the community: comparative, prospective, population based study of disease burden. **British Medical Journal**, v. 315, n. 7115, p. 1060-1064, 1997.

NICHOLSON, K. G. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. **The Lancet**, v. 357, n. 9272, p. 1937-1943, 2001.

NICHOLSON, K. G.; WOOD, J. M.; ZAMBON, M. Influenza. **The Lancet**, v. 362, n.9398, p. 1733-1745, 2003.

NOYOLA, D. E.; PAREDES, A. J.; CLARK, B.; DEMMLER G. J. Evaluation of a neuraminidase detection assay for the rapid detection of influenza A and B virus in children. **Pediatric and Developmental Pathology**, v. 3, n.2, p. 162-167, 2000.

NOYOLA, D. E.; RODRIGUEZ-MORENO, G.; SÁNCHEZ-ALVARADO, J.; MARTÍNEZ-WAGNER, R.; OCHOA-ZAVALA, R. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in México. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 23, n.2, p. 118-123, 2004.

NUNES, I. F. S. **Perfil epidemiológico das infecções causadas por vírus sincicial respiratório em crianças atendidas em hospital de Fortaleza – CE**. 2004, 115 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Médica) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

OLIVIER, C. La grippe chez l'enfant. **Virologie septembre**, n. especial, 2002.

OLIVEIRA, J. F.; de SÁ, J. P. O.; CRUZ, M. E. M. Influenza virus A and B identification and monitoring in the population of Maceió. **Ciências & Saúde coletiva**, v. 9, n. 1, p. 241-246, 2004.

OLSEN, C. W. The emergence of novel swine influenza viruses in North America. **Virus Research**, v. 85, n. 2, p. 199-210, 2002.

OXFORD, J. S.; SEFTON, A.; JACKSON, R.; INNES, W.; DANIELS, R. S.; JOHNSON, N. P. A. S. World War I may have allowed the emergence of “Spanish” influenza. **The Lancet**, v. 2, n. 2, p. 111-114, 2002.

PAIVA, T. M.; ISHIDA, M. A.; FORLEO-NETO, E.; TONILO-NETO, J.; GONÇALVES M. G.; BENEZA, M. A.; CRUZ, A. S.; HALKER, E.; OLIVEIRA, M. A.; TAKIMOTO, S. Epidemiology study of influenza vírus in Brazil III. In: Resumo do IX Encontro de Virologia, **Anais**, 2000.

PAIVA, T. M.; ISHIDA, M. A.; HANASHIRO, K. A. Y.; SCOLARO, R. M.; GONÇALVES, M. G.; BENEZA, M. A.; OLIVEIRA, M. A. S.; CRUZ, A. S.; TAKIMOTO, S. Outbreak of influenza tipe A (H1N1) in Iporanga, São Paulo state, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 6, p. 311-315, 2001.

PAIVA, T. M.; ISHIDA, M. A.; GONÇALVES, M. G.; BENEZA, M. A.; SOUZA, M. C. O.; CRUZ, A. S. Occurrence of influenza B/Hong Kong-like strains in Brazil, during 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 1, p. 51-52, 2003.

PALESE, P.; SCHULMAN J.; BODO, G.; MEINDL, P. Inhibition of influenza and parainfluenza replication in tissue culture by 2-deoxy-2, 3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA). **Virology**, v. 59, n. 2, p. 490-498, 1974.

PELTOLA, V.; ZIEGLER, T.; RUUSKANEN, O. Influenza A and B Virus Infections in Children. **Clinical Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 299-305, 2003.

PIEDRA, P. A.; ENGLUND, J. A.; GLEZEN, W. P. Respiratory syncytial virus and parainfluenza viruses. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. (Ed.). **Clinical Virology**. 1^a Ed Amer, 1997. p. 787-819.

PLANTE, M. Nasal immunization with subunit proteosome influenza vaccines induces serum HAI, mucosal IgA and protection against influenza challenge. **Vaccine**, v. 20, n. 1-2, p. 218-225, 2001.

PLOIN, D.; LIBERAS, S.; THOUVENOT, D.; FOUILHOUX, A.; GILLET, Y.; DENIS, A.; CHAPUIS, F.; LINA, B.; FLORET, D. Influenza burden in children newborn to eleven months of age in a pediatric emergency department during the peak of an influenza epidemic. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 22, supl. 10, p. S218-22, 2003.

PODDA, A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. **Vaccine**, v. 19, n. 17-19, p. 2673-2680, 2001.

POTTER, C. W. Chronicle of influenza pandemic. In: Nicholson, k. g.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. (Ed.). **Textbook of Influenza**. Blackwell science Oxford London, 1998. p. 20-39.

RAO B. L.; BANERJEE, K.; Influenza surveillance in Pune, India. **Bull World Health Organ**, v. 71, n.2, p. 177-181, 1993.

RAMAMURTY, N.; PILLAI, L. C.; GUNASEKARAN, P.; ELANGO, V.; PRIYA, P.; SHERIFF, A. K. Influenza activity among the paediatric age group in Chennai. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, n. 6, p. 776-779, 2005.

RAY, C. G.; MINNICH, L. L. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 355-357, 1987.

REINA, J.; MUNAR, M.; BLANCO, I. Evaluation of a Direct Immunofluorescence Assay, Dot-Blot Enzyme Immunoassay, and Shell Vial Culture in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections Caused by Influenza A Virus. **Diagnosis Microbiological of Infectious Disease**, v. 25, n. 3, p. 143-145, 1996.

RICHARD, N.; HAKMÉ, STAMM, D.; FLORET, D. Formes respiratoires graves de la grippe chez l'enfant. **Archives de Pédiatrie**, v. 7, Supl. 3, p. 486-488, 2000.

RIMMELZWAAN, G. F. Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model: comparison of conventional and iscom vaccines. **Journal of General Virology**, v. 78, n. Pt.4, p. 757-765, 1997.

RIMMELZWAAN, G. F. A single dose of a ISCOM influenza vaccine induces long-lasting protective immunity against homologous challenge infection but fails to protect *Cynomolgus macaques* against distant drift variants of influenza A (H3N2) viruses. **Vaccine**, v. 20, n. 1-2, p. 158-163, 2001.

RODRIGUES, O. G.; ROZOV, T.; SILVA, E. M. K.; KOPELMAN, B. I. Infecções virais em crianças portadoras de doenças respiratória aguda, atendidas em um centro de saúde escola, em Belém, Pará, Brasil. **Pediatria (São Paulo)**, v.26, n. 1, p. 13-20, 2004.

SAMUELSON, J. Doenças Infecciosas. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Ed.). **Patologia Estrutural e Funcional**. 6^a ed. Guanabara Koogan, 2000. p. 313.

SANNI, E.; MAZAUD, S.; ODIEVRE, M. WEILL, C.; LAURENT, C, OLIVIER, C. Une saison de grippe chez les enfants hospitalisés (hiver 2001/2002). **Journal de Pédiatrie et de Puériculture**, v. 17, n. 6, p. 331-337, 2004.

SANTOS, D. E. M.; CARDIAS, C. A. S.; MELLO, W. A. Inquérito soroepidemiológico para os vírus influenza em Belém, Pará, Brasil, 1992-1993. **Caderno de Saúde Pública**, v. 13, n. 1, p. 119-125, 1997.

SHEK, L. P. C.; LEE, B. W. Epidemiology and seasonality of respiratory tract virus infections in the tropics. **Paediatric Respiratory Reviews**, v. 4, n. 2, p. 105-111, 2003.

SHEN, K.; ZHAORI, G.; ZWEYGBERG-WIRGART, B.; YING, M.; GRANDIEN, M.; WAHREN, B.; LINDE, A. Detection of respiratory viruses in nasopharyngeal secretions with immunofluorescence technique for multiplex screening – an evaluation of the chemicon assay. **Clinical and Diagnostic Virology**, v. 6, n. 2-3, p. 147-154, 1996.

SIMONSEN, L. Influenza-related morbidity and mortality among children in developed and developing countries. **International Congress Series**, v. 1219, p. 12-19, 2001.

SIMPSON, S. Q.; JONES, P. W.; DAVIES, P. D. O.; CUSHING, A. **Social impact of respiratory infections.** *Chest*, v. 108, supl. 2, p. 635-695, 1995.

SIQUEIRA, M. M.; FERREIRA, V.; NASCIMENTO, J. P. Vírus diagnosis: comparison of isolation, immunofluorescence and enzyme immunoassay. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 2, p. 225-232, 1986.

SOUZA, L. S. F.; RAMOS, E. A. G.; CARVALHO, F. M.; GUEDES, V. M. C. R.; SOUZA, L. S.; ROCHA, C. m.; SOARES, A. B.; VELLOSO, L. F.; MACEDO, I. S.; MOURA, F. E. A.; SIQUEIRA, M.; FORTES, S.; JESUS, C. C.; SANTIAGO, M. G.; CARVALHO, A. M. S.; ARRUDA, E. **Viral Respiratory Infections in Young Children Attending Day Care in Urban Northeast Brazil.** *Pediatric Pulmonology*, v. 35, n. 3, p. 184-191, 2003.

STEININGER, C.; KUNDI, M.; ABERLE S. W.; ABERLE, J. H.; POPOW-KRAUPP, T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2051-2056, 2002.

STOCKTON, J.; ELLIS, J. S.; SAVILLE, M.; CLEWLEY, J.P.; ZAMBON, M. C. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2990-2995, 1998.

STRALIOTTO, S. M.; SIQUEIRA, M. M.; MULLER, R. L.; FISCHER, G. B.; CUNHA, M. L. T.; NESTOR, S. M. **Viral etiology of acute respiratory infections among children in Porto Alegre, RS, Brazil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 35, n. 4, p. 283-291, 2002.

SUGAYA, N.; MITAMURA, K.; NIRASAWA, M. TAKAHASHI, K. The impact of winter epidemics on influenza and respiratory syncytial vírus on paediatric admissions to na urban general hospital. **Journal of Medical Virology**, v. 60, n.1, p. 102-106, 2000.

SUGRUE, R. J.; HAY, A. J. Structural characteristies of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. **Virology**, v. 180, n. 2, p. 617-624, 1991.

SUNAKORN, P.; CHUNCHIT, L.; NILTAWAT, S.; WANGWEERAWONG, M, JACOBS, R. F. Epidemiology of acute respiratory infections in young children from Thailand. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 9, n. 12, p. 873-877, 1990.

SUNG, R. Y.; CHAN, R. C.; TAM, J. S.; CHENG, A. F.; MURRAY, H. G. Epidemiology and aetiology of acute bronchiolitis in Hong Kong infants. **Epidemiology of Infections**, v. 108, n.1, p. 147-154, 1992.

SUTMÖLLER, F.; ANDRADE FERRO, Z. P.; ASENSI, M. D.; FERREIRA, V.; MAZZEI, I. S.; CUNHA, B. L. Etiology of acute respiratory tract infections among children in a combined community and hospital study in Rio de Janeiro. **Clinical Infectious Disease**, v. 20, n. 4, p. 854-860, 1995.

SVS. **O desafio da influenza: epidemiologia e Organização da vigilância no Brasil.** Boletim Eletrônico Epidemiológico, n.1, 2004. Disponível em: <<http://saude.gov.br/svs>>, acesso em 30 mai. 2005.

TAUBENBERGER J. K.; LAYNE S. P. Diagnosis of influenza virus: coming to grips with the molecular era. **Molecular Diagnosis**. v. 6, n. 4. p. 291-305, 2001.

TRISTAM, D. A.; WELLIVER, R. C. Respiratory syncytial virus. In: LENNETTE, E. H.; LENNETTE, D. A.; LENNETTE, E. T. (Ed.). **Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections**. 7^a ed. Washington: American Public Health Association, 1995. p. 539-552.

TSAI, H. P.; KUO, P. H.; LIU, C. C.; WAND, J. R. Respiratory viral infections among pediatric inpatients and outpatients in Taiwan from 1997 to 1999. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 39, n.1, p. 111-118, 2001.

ULMER, J. B. Influenza DNA vaccines. **Vaccine**, v. 20, supl. 2, p. S74-S76, 2002.

VAN MILAAN, A. J.; SPRENGER, M. J. W.; ROTHBARTH, P. H.; BRANDENBURG, A. H.; MASUREL, N.; CLAAS, E. C. J. Detection of respiratory syncytial virus by RNA-polymerase chain reaction and differentiation of subgroup with oligonucleotide probes. **Journal of Medical Virology**, v. 44, n. 1, p. 80-87, 1994.

VAN der WERF, S. Structure et variation des virus grippaux. In: **Infections virales respiratoires-Tome I: Gripe et infections virales des voies aériennes supérieures**. Paris: Editions scientifiques et medicales Elsevier, 2001. p. 49-60.

VAN REGENMORTEL, M. H. V.; FAUQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E.B.; ESTES, M.K.; LEMON, S.M.; MANILOFF, J.; MAYO, M.A.; MCGEOCH, D.J.; PRINGLE, C.R.; WICKNER, R.B. (Ed.). **Virus taxonomy: Seventh International Committee on Taxonomy of Viruses Report**. 1^aEd. Academic Press, 2000. 1024pp.

VAN ROSSUM, C. T. M.; SHIPLEY, M. J.; VAN de MHEEN, H.; GROBBEE, D. E.; MARMOT, M. G. Employment grade differences in cause specific mortality. A 25 year follow up of civil servants from the first Whitehall study. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 54, n.3, p. 178-184, 2000.

VEGA-BRICEÑO, L. E.; POTIN, M.; BERTRAND, P.; SÁNCHEZ, I. Infección respiratoria por virus influenza em niños: ¿Qué aprendimos durante el año 2004?. **Revista Médica del Chile**. v. 133, n.8, p. 911-918, 2005.

VIEGAS, M.; BARRERO, P. R.; MAFFEY, A. F.; MISTCHENKO, A. S. Respiratory viruses seasonality in children under five years of age in Buenos Aires, Argentina. A five-year analysis. **Journal of Infection**, v. 49, n.3, p. 222-228, 2004.

VON ITZSTEIN, I.; WU, W-Y.; KOK, G. Rational designers of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication. **Nature**, v. 363, n. 6428, p. 418-423, 1993.

WALDMAN, R. H. An evaluation of influenza immunization: influenza of route of administration and vaccine strain. **Bull World Health Organization**, v. 41, n. 3, p. 543-548, 1969.

WALLACE, L. A.; COLLINS, T. C.; DOUGLAS, J. D. M.; McINTYRE, S.; MILLAR, J.; CARMAN, W. F. Virological surveillance of influenza-like illness in the community using PCR and serology. **Journal of Clinical Virology**, v. 31, n.1, p. 40-45, 2004.

- WANG, Y.; HUANG, Y.; CHANG, L.; KAO, H.; LIN, P.; HUANG, C.; LIN, T. Clinical characteristics of children with influenza A virus infection requiring hospitalization. **Journal of Microbiology, Immunology and infection**, v. 36, n.2, p. 11-116, 2003.
- WEBBY, R. J.; SWENSON, S. L.; KRAUSS, S. L.; GOYAL, S. M.; ROSSOW, K. D.; WEBSTER, R. G. Envolving H3N2 and emerging H1N2 swine influenza viruses in the United States. **International Congress Series**, v. 1219, p. 241-249, 2001.
- WEBBY, R. J.; WOOLCOCK, P. R.; KRAUSS, S. L.; WEBSTER, R. G. Reassortment and Interspecies Transmission of North American H6N2 Influenza Viruses. **Virology**, v. 295, n. 1, p. 44-53, 2002.
- WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Are We Ready for Pandemic Influenza? **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1519-1522, 2003.
- WEBSTER, R. G.; GERACI, J.; PETURSSON, G.; SKIMISSON, K. Conjuntivitis in human being caused by influenza A virus seals. **The New England Journal of Medicine**, v. 304, n.15, p. 911, 1981.
- WEBSTER, R. G. Influenza: an emerging disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, p. 436-341, 1998.
- WEIR, E. The changing ecology of avian flu. **Canadian Medical Association Journal**, vol 173, n. 8, p. 869-870, 2005.
- WHO. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A/(H5N1) reported to WHO. Disponível em: <http://who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_tablee>, acesso em 17 novembro, 2005.
- WILLS, R. J. Update on rimantadine's clinical pharmacokinetics. **Journal of Respiratory Disease**, v. 10, n.1, p. 20-25, 1989.
- WU, M. J.; ING, T. S.; SOUNG, L. S. Amantadine hydrochloride pharmacokinetics in patients with impaired renal function. **Clinical Nephrology**, v. 17, n. 1, p. 19-23, 1982.
- YEWDELL, J.; GARCIA-SASTRE, A. Influenza virus still surprises. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 414-418, 2002.
- YUEN, K. Y.; CHAN, P. K. S. PEIRIS, M. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian influenza A H5N1 virus. **The Lancet**, v. 351, n. 9101, p. 467-471, 1998.
- ZAMBON, M. C. The pathogenesis of influenza in humans. **Reviews in Medical Virology**, v. 11, n. 4, p. 227-241, 2001.
- ZAMBON, C.; HAYS, J.; WEBSTER, A.; NEWMAN, R.; KEENE, O. Diagnosis of influenza in the community. Relationship of clinical diagnosis to confirmed virological, serologic, or molecular detection of influenza. **Archives of Internal Medicine**, v. 161, n.17, p. 2116-2122, 2001.
- ZAMBRANO, B.; VILLARROEL, L.; GARCÍA, A.; AYMARD, M.; VALETTE, M.; BOADA, M.; SALGADO, J.; VALERI, F. Estudio epidemiológico de virus respiratorios en

niños en el Hospital Pediátrico Dr. Elías Toro IVSS, Caracas. **Archivos Venezolanos de Puericultura y Pediatría**, v. 62, n. 1, p. 31-34, 1999.

APÊNDICE A - Soluções e reagentes

SOLUÇÃO DE PBS 10X CONCENTRADO ESTÉRIL

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 80g |
| KH ₂ PO ₄ | 2g |
| Na ₂ HPO ₄ | 21g |
| KCl | 2g |
| Água destilada qsp | 1000mL |

PREPARO DE TRIS-HCl A 0,1M PH 6,4

| | |
|--------------------|--------|
| Tris Hidrocloreto | 15,75g |
| Água destilada qsp | 1000mL |

PREPARO DE ETILENODIAMINOTETRACÉTICO (EDTA) 0,2M

| | |
|--------------------|--------|
| EDTA | 58,4g |
| Água destilada qsp | 1000mL |

Diluir a 37°C e ajustar o pH para 8.0

ETANOL 70%

| | |
|--------------------|---------|
| Etanol PA | 72,9 mL |
| Água destilada qsp | 100mL |

SÍLICA ÁCIDA

Em uma proveta de 500 mL, adicionar 60 g de sílica + 500 mL de H₂O deionizada e deixar repousar por 24h à temperatura ambiente.

Remover 430 mL do sobrenadante e ressuspender o pellet em 500 mL de H₂O deionizada. Deixar 5h à temperatura ambiente.

Remover 440 mL do sobrenadante e adicionar 600 µL de HCl concentrado para atingir pH 2. Aliquotar, autoclavar e estocar protegido da luz.

TAMPÃO DE LISE L2

O tampão deve ser preparado ao abrigo da luz e acondicionado em temperatura ambiente em frascos rosqueados.

Isotiocianato de guanidina 60g
 Tris-HCl a 0,1M pH 6,4 50mL

TAMPÃO DE LISE L6

O tampão deve ser preparado ao abrigo da luz e acondicionados em temperatura ambiente em frascos rosqueados.

Isotiocianato de guanidina 60g
 Tris-HCl a 0,1M pH 6,4 50mL
 Triton 1,3mL
 Solução de EDTA 0,2M 11mL

SOLUÇÃO PARA RESGATE DE RNA

Para cada amostra:

Inibidor de RNase 1µL
 Água milliQ livre de DNA 30µL

SOLUÇÃO DE NAOH 10M

Solução deve ser preparada sob refrigeração, gelo ou água corrente.

NaOH 400g
 Água destilada qsp 1000mL

“RESPIRATORY PANEL I VIRAL SCREENING & IDENTIFICATION KIT” (Chemicon International Inc.)

MEIO ESSENCIAL MÍNIMO (MEM)

MEM (Gibco) com sais de Earle, sem L-glutamina, sem bicarbonato de sódio 15,75g
 L-glutamina a 2% (Gibco), pH 7,3 10mL

| | |
|--|--------|
| Solução de pinicila-estreptomicina (Gibco) 10000U/mL de penicilina G sódica a 10mL | |
| 10000 μ g/mL de sulfato de estreptomicina em 0,85% de salina | |
| Bicarbonato de sódio P.A. a 10% (Dinâmica) | 7mL |
| Água Milli-Q qsp | 1000mL |

Dissolver os reagentes em água Milli-Q estéril. Ajustar o pH para 7,2-7,4. Esterilizar por filtração.

APÊNDICE B – Resultados da RT PCR (2003-2004)

| RIFI positiva | RT-PCR | |
|---------------------------|----------|----------|
| | Positivo | Negativo |
| 134/03 – Influenza A | H3 | |
| 136/03. – Influenza A | H3 | |
| 139/03. – Influenza A | H3 | |
| 149/03. – Influenza A | | Negativo |
| 150/03. – Influenza A | H3 | |
| 157/03. – Influenza A | H3 | |
| 161/03. – Influenza A | H3 | |
| 167/03. – Influenza A | H3 | |
| 170/03. – Influenza A e B | | Negativo |
| 172/03. – Influenza B | | Negativo |
| 178/03. – Influenza B | B | |
| 186/03. – Influenza B | | Negativo |
| 190/03. – Influenza A | H3 | |
| 193/03. – Influenza B | | Negativo |
| 197/03. – Influenza A e B | H3 | |
| 200/03. – Influenza A | H3 | |
| 04/04. – Influenza A | H3 | |
| 23/04. – Influenza A | H3 | |
| 24/04. – Influenza A | H3 | |
| 25/04. – Influenza A | H3 | |
| 29/04. – Influenza A | H3 | |
| 31/04. – Influenza A | H3 | |
| 33/04. – Influenza A | H3 | |
| 36/04. – Influenza A | H3 | |
| 37/04. – Influenza A | H3 | |
| 39/04. – Influenza A | H3 | |
| 40/04. – Influenza A | H3 | |
| 44/04. – Influenza A | H3 | |
| 46/04. – Influenza A | H3 | |
| 49/04. – Influenza A | H3 | |
| 53/04. – Influenza A | H3 | |
| 60/04. – Influenza A | H3 | |
| 63/04. – Influenza A | H3 | |
| 64/04. – Influenza A | H3 | |
| 67/04. – Influenza A | H3 | |
| 68/04. – Influenza A | | Negativo |
| 78/04. – Influenza A | H3 | |
| 88/04. – Influenza A | H3 | |
| 101/04. – Influenza A | H3 | |
| 103/04. – Influenza B | B | |
| 109/04. – Influenza A | H3 | |
| 111/04. – Influenza A | H3 | |
| 112/04. – Influenza A | | Negativo |
| 113/04. – Influenza A | H3 | |
| 116/04. – Influenza A | | Negativo |
| 118/04. – Influenza A | H3 | |
| 148/04. – Influenza A | H3 | |

ANEXO A – Termo de consentimento livre esclarecido

**PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS
AGUDAS CAUSADAS PELO VÍRUS INFLUENZA EM CRIANÇAS
ATENDIDAS NO HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN,
FORTALEZA-CE (2001-2004)**

O objetivo desta pesquisa é conhecer melhor as características da gripe em crianças que são atendidas nos ambulatórios, enfermarias ou serviço de emergência do Hospital Infantil Albert Sabin, na cidade de Fortaleza.

Será coletada a secreção nasal, através de aspiração com uma sonda que é colocada na narina da criança.

O responsável pela criança ou o médico que acompanha o caso poderão ter acesso ao resultado obtido. Esse exame é gratuito.

Em caso de dúvida ou solicitação de resultado, entrar em contato com Marlos Gomes Martins, telefone nº 288-8303 ou Profª. Drª. Fernanda Edna Araújo Moura, telefone nº 9996-1332 ou 288-8303.

Eu, _____, declaro que após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, concordo em deixar o menor de idade _____ participar do presente protocolo de pesquisa, sendo eu o seu responsável legal.

Fortaleza, _____ de _____ de 200____

Assinatura do Responsável pela Criança

Assinatura do Responsável pela Coleta

ANEXO B – Ficha epidemiológica

Projeto: PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DAS INFECÇÕES RESPIRATÓRIAS AGUDAS CAUSADAS PELO VÍRUS INFLUENZA EM CRIANÇAS ATENDIDAS NO HOSPITAL INFANTIL ALBERT SABIN, FORTALEZA-CE (2001-2004)

DADOS PESSOAIS

Nome do Paciente: _____
 Bairro: _____ Telefone: _____ Pessoa p/ Contato: _____
 Idade: _____ Sexo: Feminino () Masculino ()

PROCEDÊNCIA

Ambulatório () Emergência () Observação () UTI ()
 Prontuário: _____ Leito: _____ Bloco: _____

ASPECTOS SÓCIO-ECONÔMICOS

Renda Familiar: _____
 Pai e Mãe Empregados () Pai e Mãe Desempregados () Pai ou Mãe Empregados ()
 Escolaridade do Pai: _____ Mãe: _____
 Quantas Pessoas Moram em Casa: _____ Nº de Cômodos: _____
 Freqüenta Creche/Escola: Sim () Não () Quantas Horas por Dia: _____

HISTÓRICO DO PACIENTE

Parto Normal () Cesárea () Fórceps () A Termo () Prematuro ()
 Não Mamou () Mamou < 6 Meses () Mamou > 6 meses () Ainda Mama ()
 Vacinação: Em Dia () Atrasada ()
 1ª Vez que Cansa: Sim () Não () Idade que Cansou a 1ª Vez: _____
Internação Anterior por Problema Respiratório: Sim () Não () Nº de Vezes _____

Gripa Freqüentemente: Sim () Não ()
 Nº de Vezes nos Últimos Dois Meses: () 1-2x () 3-5x () >5x

HISTÓRICO FAMILIAR

História de Cansaço na Família: Mãe () Pai () Irmãos () Primos () Tios () Avós ()
 Outro Familiar com Infecção: Sim () Não () Quem _____
 Fumantes em Casa: Sim () Não () Quem _____

EXAME FÍSICO E ASPECTOS CLÍNICOS

Peso: _____ Temperatura: _____ FR: _____
 Queixa Principal: _____
 Tempo de Início dos Sintomas: _____
 Coriza () Obstrução Nasal () Espirros () Tosse Cheia () Tosse Seca () Dispneia ()
 Febre () Conjuntivite () Otite () Dor de Garganta () Dor de Cabeça () Gemente ()
 Rouquidão () Anorexia () Vômitos () Diarréia () Cianose () Convulsões ()
 Doenças Associadas: Sim () Não () Qual _____
 Ausculta Pulmonar: Roncos () Sibilos () Estertores () Tiragem Intercostal () Tiragem Supraesternal () Batimentos de Asa do Nariz () Exantema ()

EXAMES REALIZADOS

Raio-X de Tórax: Sim () Não ()

| Data | Resultado – Achados Radiológicos |
|------|--|
| | Normal () Condensação () Infiltrado Intersticial () Hiperinsulfilação () Outros _____ |
| | Normal () Condensação () Infiltrado Intersticial () Hiperinsulfilação () Outros _____ |
| | Normal () Condensação () Infiltrado Intersticial () Hiperinsulfilação () Outros _____ |

Hemograma

| Data | Ht | Hb | Leuc. | Segm. | Linfoc. | Linf. Atípicos | Basóf. | Eosin. | Monóc. | Plaq. |
|------|----|----|-------|-------|---------|----------------|--------|--------|--------|-------|
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | |

Gasometria

| Data | pH | PCO ₂ | PO ₂ | Sat. O ₂ | | | |
|------|----|------------------|-----------------|---------------------|--|--|--|
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |
| | | | | | | | |

Hemocultura: Sim () Não () Negativa () Positiva ()

Bactéria Isolada: _____

Antibiograma: Resistente _____
Sensível _____

TRATAMENTO INSTITUÍDO PELO MÉDICO

Antitérmico () Aerosol () Salbutamol () Corticóide () Sorine () Cateter de O₂ ()
Oxi-Hood () Ventilação Mecânica () Adrenalina () Antibiótico ()

| | Especificação | Início | Término | Nº Total de Dias | |
|---------------|---------------|--------|---------|------------------|--|
| Antibiótico 1 | | | | | |
| Antibiótico 2 | | | | | |
| Antibiótico 3 | | | | | |
| Antibiótico 4 | | | | | |

Outros: _____

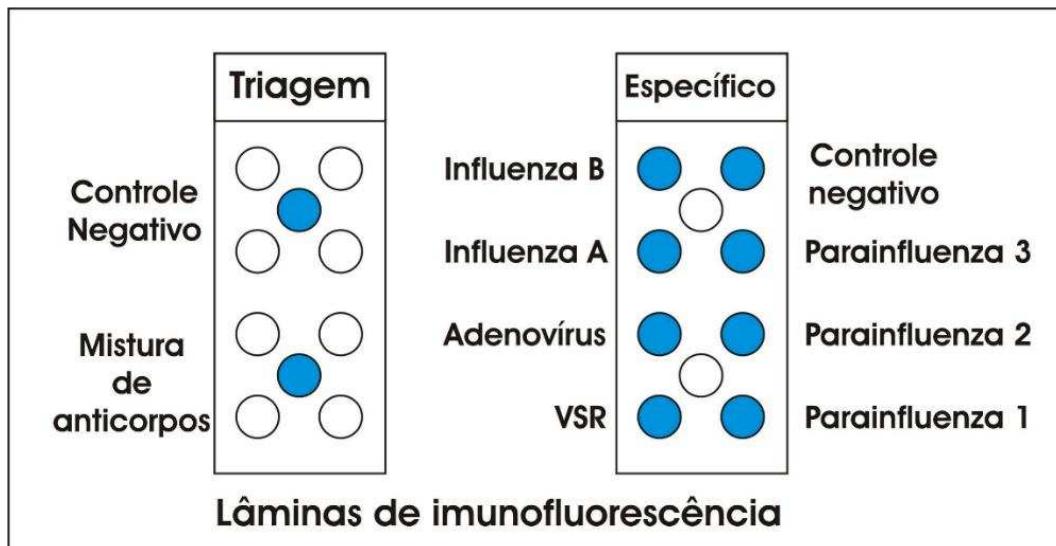
Data Admissão: _____ Data Alta: _____ Dias Internação: _____

Diagnóstico Provável: _____

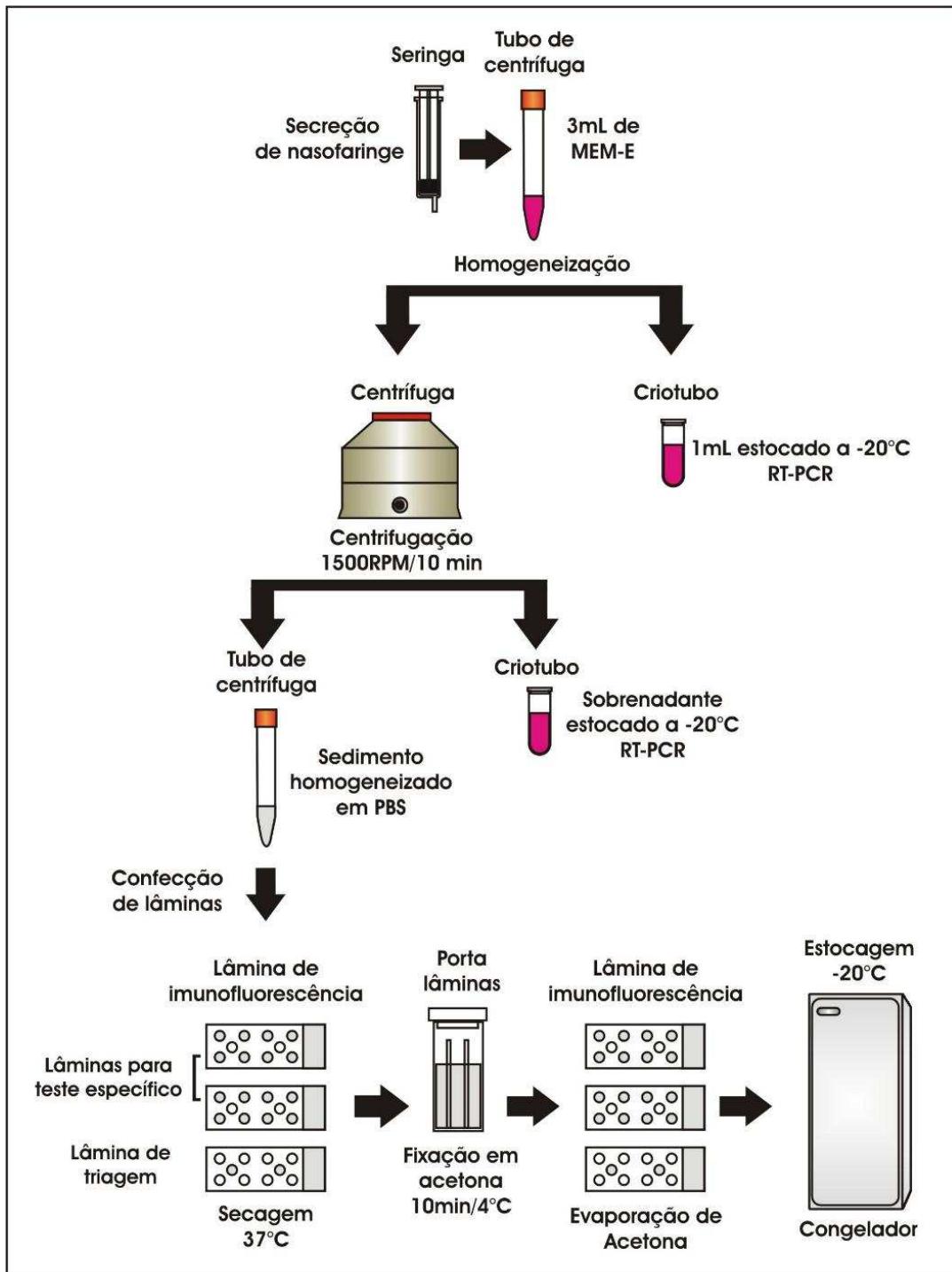
Diagnóstico Final: _____

Óbito: Sim () Não ()

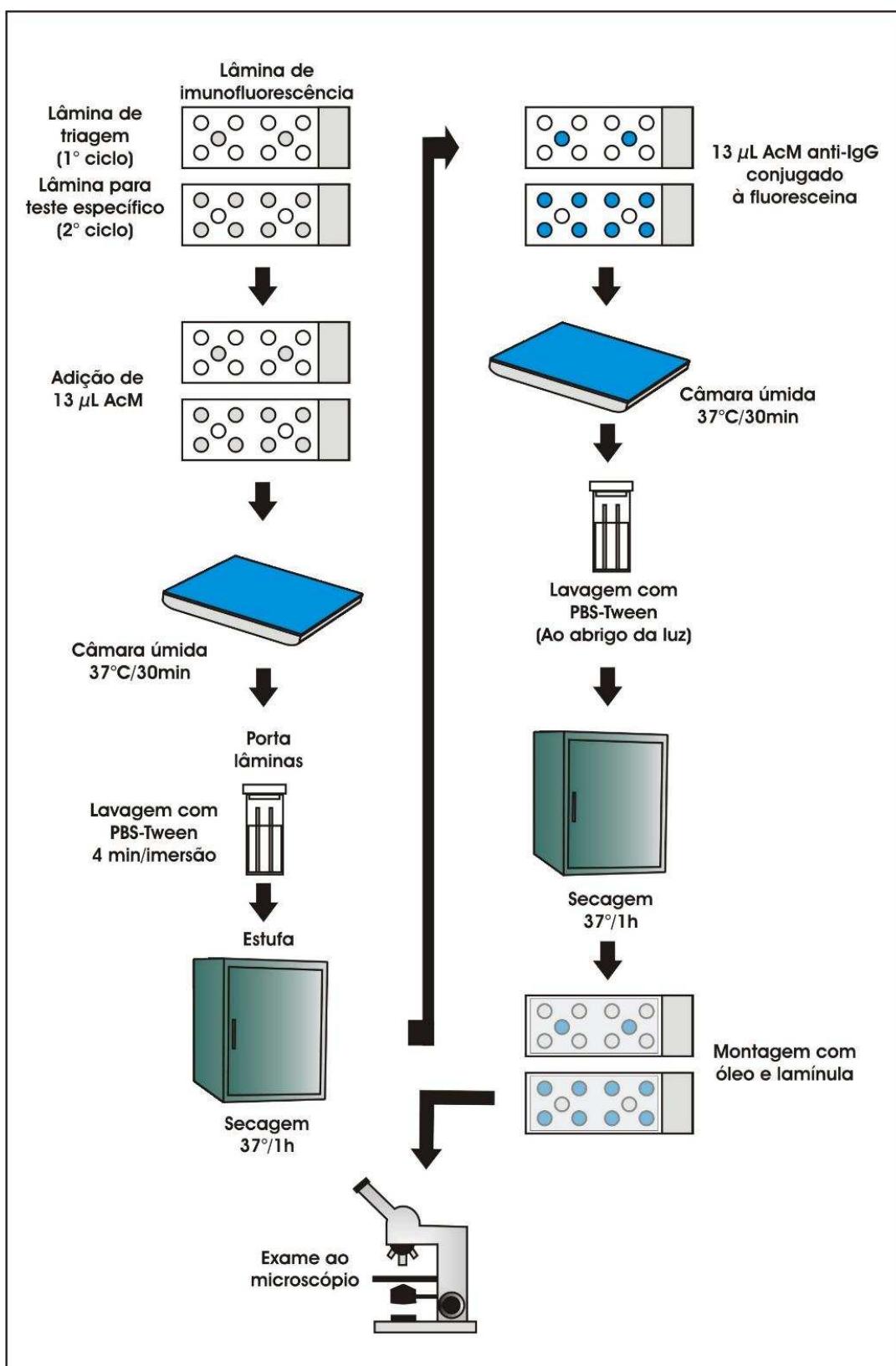
ANEXO C – Esquemas de lâminas de imunofluorescência



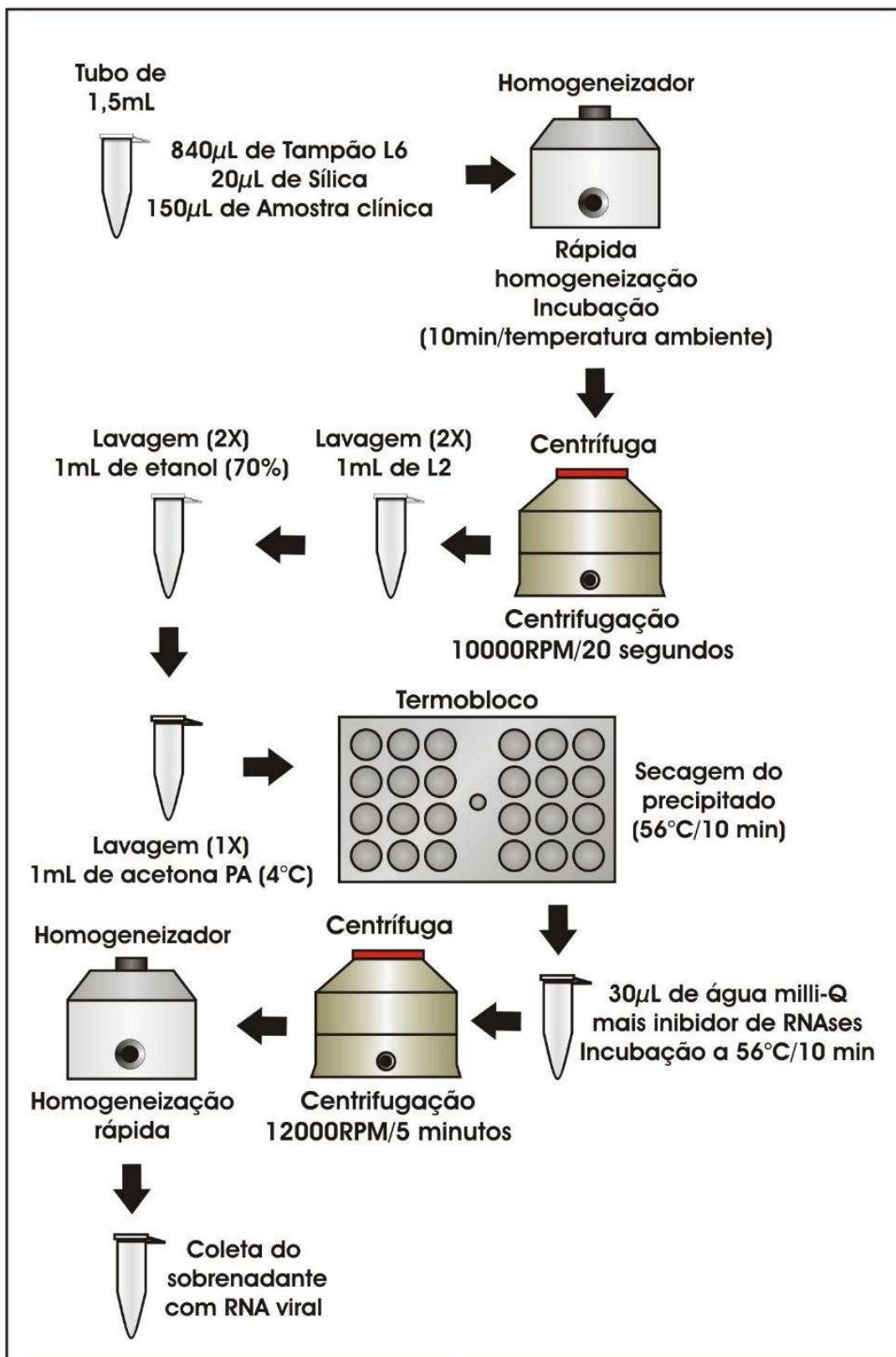
ANEXO D – Processamento das amostras



ANEXO E – Reação de imunofluorescência indireta



ANEXO F – Extração de RNA



ANEXO G – RT-PCR

