

Érica Valessa Ramos Gomes¹
 Fernanda Modesto Tolentino²
 Milena Polotto de Santi³
 Janaína Olher Martins Montanha⁴
 Aripuanã Sakurada Aranha Watanabe⁵

AVALIAÇÃO SITUACIONAL DE INFLUENZA PÓS PANDEMIA DE 2009 – UMA BREVE REVISÃO

Situational Assessment of Influenza post 2009 Pandemic - a brief review

RESUMO

Os vírus influenza são responsáveis por epidemias anuais com gravidade da doença variável. Causam infecção respiratória aguda com elevada transmissibilidade devido sua alta variabilidade genética, capacidade de adaptação e rápida disseminação. Os vírus influenza apresentam genoma fragmentado, o que ocasiona variações antigênicas frequentes, e conseqüentemente pode induzir o aparecimento de subtipos mais virulentos, como ocorreu em 2009, quando foi registrada pandemia por um novo vírus *Influenza A H1N1*. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que a gripe acometa 5 a 15% da população, ocasionando 3 a 5 milhões de casos graves e 250.000 a 500.000 mortes anualmente. As epidemias anuais de gripe e o risco de novas pandemias tornam o monitoramento epidemiológico do vírus influenza fundamental e, para isto, a OMS coordena a Rede Mundial de Vigilância da Influenza com a finalidade de fornecer informações necessárias para a escolha das variantes virais que farão parte da composição anual da vacina, visto que a vacinação é uma das medidas mais efetivas para prevenção da gripe e suas complicações. Além disso, a rede constitui uma vigilância rápida para identificações de vírus influenza emergentes com potencial epidêmico ou pandêmi-

Gomes EVR, Tolentino FM, Santi MP, Montanha JOM, Watanabe ASA. Avaliação Situacional de Influenza pós Pandemia de 2009 – uma breve revisão. *Hansen Int*. 2015; 40 (1): p. 33-45.

co. Esta vigilância é viabilizada pelos resultados dos testes laboratoriais que são ferramentas importantes para a Saúde Pública, sendo fundamentais para a contenção e prevenção dos vírus circulantes. O objetivo deste estudo foi apresentar informações relacionadas ao vírus influenza e a doença, como são realizados o diagnóstico e monitoramento pelas redes de vigilâncias mundiais pós-pandemia e, ainda, quais os novos desafios que se apresentam.

Palavras-chave: Influenza, H1N1, Sentinela de Gripe, Vacinação

Artigo submetido em 19/10/2015

Aprovado em 16/03/2016

- 1 Biomédica do Instituto Adolfo Lutz - CLR de São José do Rio Preto.
- 2 Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz - CLR de São José do Rio Preto.
- 3 Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo Lutz - CLR de São José do Rio Preto.
- 4 Bióloga - Diretora Técnica I do Núcleo de Ciências Biomédicas do Instituto Adolfo Lutz - CLR de São José do Rio Preto.
- 5 Pós doutorando e professor da Pós Graduação Stricto Sensu da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

ABSTRACT

Influenza viruses are responsible for annual epidemics with patients presenting variable degrees of disease severity. These virus can cause acute respiratory infection with a high transmissibility due to its high genetic variability, adaptability and rapid spread. Influenza viruses have fragmented genome which causes frequent antigenic variation, which can result in more virulent subtypes emergence, as occurred in 2009 when it was described a new pandemic influenza virus H1N1. WHO estimates that flu affects 5-15% of the population and it causes 3 to 5 million of severe cases and 250.000 to 500.000 deaths annually. The annual influenza epidemics and the new pandemics risk highlights the importance of Influenza virus epidemiological monitoring. Based in this concern WHO created and coordinates the Global Influenza Surveillance and Response System in order to provide necessary information for viral variants selection that will be part of vaccine annual composition, since that, vaccination is one of the most effective measures for influenza prevention and its complications. In addition, the network is a rapid surveillance of emerging influenza virus identifications with potential to cause epidemic or pandemic situations. The surveillance is enable due to laboratory tests results which are important tools for public health, with essential role for circulating viruses containment and prevention. The aim of this study was to present information related to influenza virus and flu disease, how the diagnosis and monitoring are performed by global surveillance networks at post pandemic time and, also, the new challenges facing.

Keywords: Influenza, H1N1, Sentinel Influenza, Vaccination

INTRODUÇÃO

A capacidade do vírus influenza de sofrer variações antigênicas frequentes e imprevisíveis, o destaca entre as doenças emergentes. Os vírus influenza causam epidemias anuais recorrentes e menos frequentemente pandemias, que atingem quase todas as faixas etárias, devido sua alta variabilidade genética, capacidade de adaptação e rápida disseminação¹⁻⁵.

A natureza fragmentada do material genético do vírus influenza induz altas taxas de mutação durante a replicação viral, principalmente nas duas glicoproteínas de superfície do vírus, a Hemaglutinina e a Neuraminidase. Estas mutações ocorrem de forma independente e provocam o aparecimento de novas variantes

para as quais a população ainda não apresenta imunidade, considerando que uma infecção prévia por determinada variante confere pouca ou nenhuma proteção contra os vírus de surgimento mais recente^{1-3,6,7}.

O vírus influenza causa uma infecção viral aguda que afeta o sistema respiratório com elevada transmissibilidade, distribuição global e tendência a se disseminar facilmente em epidemias sazonais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que a influenza acomete 5 a 15% da população, ocasionando 3 a 5 milhões de casos graves e 250.000 a 500.000 mortes anualmente^{5,8}.

Há relatos de epidemias por Influenza desde 512 a.C. a 212 a.C. Na Idade Média a gripe foi chamada de *Influenza* pela suposta influência das estrelas e planetas sobre a fisiologia humana. Várias epidemias por Influenza ocorreram em todo o mundo, com registros na África, Ásia e Europa entre os séculos XVI a XIX e algumas alcançaram outros continentes, como a "Gripe Russa" que chegou à América Latina em 1890 e matou cerca de 1 milhão de pessoas. A maior das epidemias registradas foi a "Gripe Espanhola" (1918-1919), cujos dados literários estimam entre 20 a 40 milhões de mortes⁹.

Em 2009, foi registrada uma nova pandemia por um subtipo do vírus *Influenza A H1N1*, inicialmente denominada "Gripe Suína", resultante do rearranjo entre genes virais de influenza aviária, suína e humana que resultaram uma recombinação nunca antes descrita¹⁰. Em abril deste mesmo ano, no sul da Califórnia, o CDC confirmou duas mortes pelo novo H1N1, mesmo período em que ocorriam óbitos pela mesma doença respiratória aguda na província de Vera Cruz, no México. Durante a fase inicial da pandemia, a maioria dos casos estava entre os viajantes, primeiro entre aqueles que retornavam do México e, em seguida, entre os que retornavam dos Estados Unidos. O vírus H1N1, disseminado por trabalhadores e turistas, rapidamente chegou a todo hemisfério norte e em semanas se espalhou pelo mundo. Em julho (2009) já havia mais de 94.000 casos confirmados em 100 países diferentes e acredita-se que o número real de casos tenha sido subnotificado. A pandemia de influenza, cujo início foi confirmado no México, foi oficializada em junho de 2009 pela OMS, após um intervalo de 40 anos^{4,9,11-15}. O início da fase pós-pandêmica foi declarado em agosto de 2010 pela OMS junto à estimativa de que 18.449 pessoas morreram como resultado do vírus em 214 países e territórios ou comunidades no exterior^{16,17}.

O período pós pandemia caracterizou-se pelo padrão sazonal de transmissão que o H1N1 passou a apresentar, no qual 20-40% da população em algumas áreas adquiriram um nível de imunidade prote-

tora após infecção pelo vírus H1N1pdm09 e também pela boa cobertura vacinal relatada por muitos países, especialmente em grupos de risco¹⁷.

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi apresentar informações relacionadas ao vírus influenza e a doença, como são realizados o diagnóstico e monitoramento pelas redes de vigilâncias mundiais pós pandemia e, ainda, quais os novos desafios que se apresentam.

3. METODOLOGIA

A abordagem metodológica empregou como instrumento a pesquisa exploratória de caráter bibliográfico, utilizando como base de dados MEDLINE, PUBMED, LILACS e SciELO e Sistema de Informação da Biblioteca da OMS (WHOLIS). Os unitermos selecionados para a pesquisa, associados ou não, foram: Influenza, H1N1, Sentinela de Gripe, vacinação, diagnóstico e epidemiologia. O processo de busca resultou na inclusão de 71 artigos, informes técnicos, teses, monografias e demais investigações baseadas em evidências científicas e/ou de caráter investigativo epidemiológico/operacional. Livros, artigos e outros documentos impressos fizeram parte da metodologia com propósito de sustentar teoricamente esta revisão.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1 O VÍRUS

O agente etiológico da gripe é o *Myxovirus influenzae*, pertencente à família *Orthomyxoviridae*, também denominado vírus influenza. Apresenta um RNA fita simples segmentado, composto por 8 segmentos diferentes responsáveis pela produção de polimerases (PB2, PB1 e PA), proteínas estruturais (M1, M2 e NP) e não estruturais (NS1 e NS2) dos quais, os segmentos 4 e 6 do genoma são codificadores das respectivas proteínas de superfície Hemaglutinina (HA), responsável pela ligação do vírus aos receptores de ácido siálico da célula hospedeira, e Neuraminidase (NA), responsável pela saída das partículas virais do interior das células infectadas. São descritas 18 hemaglutininas e 11 neuraminidasas, cujas combinações determinam os sorotipos^{11,18}. Dessas combinações, somente o H1N1, H2N2 e H3N2 são capazes de infectar células humanas^{3,19}. O H5N1 aviário, H7 e o H9N2 podem, ocasio-

nalmente, atravessar a barreira das espécies e infectar humanos, porém têm baixa capacidade de disseminação pessoa a pessoa, em parte, devido a diferenças nos receptores celulares de ligação^{6,7}.

A expressão genética variada do receptor específico da hemaglutinina, o ácido siálico, é a principal barreira de infecção interespecies. Os suínos apresentam polimorfismos dessa molécula, que permitem coinfeção também por vírus humanos e aviários. Essa característica torna estes animais importantes hospedeiros na epidemiologia da transmissão, pois ao abrigar linhagens diferentes de vírus influenza A, permite que rearranjos genéticos entre os fragmentos independentes ocorram gerando um vírus mais patogênico à espécie humana, como ocorreu em 2009. O H1N1pdm09 apresenta segmentos genômicos originários de vírus suíno clássico, das linhagens suínas norte americana e eurásiana e do H3N2 sazonal humano. O vírus norte americano é derivado de um rearranjo triplo entre H1N1 suíno clássico, H3N2 humano e vírus aviário que passou a circular na América do Norte a partir de 1998 entre os porcos e que em 2005 causou infecção em um adolescente que teve contato com animais infectados em Winsconsin, EUA. Já a emergência da linhagem eurásia (EA-SIV) data de 1979 quando um vírus aviário (*avian-like swine*) passou a circular entre os rebanhos suínos da Europa e forneceu as sequências da NA e M do H1N1pdm09^{10,15,20-22}.

As infecções simultâneas com diferentes linhagens de influenza A e a recombinação genética, mecanismo responsável pelas variações antigênicas e evolução do vírus, podem afetar o *fitness* viral relacionado à patogenicidade e transmissão²³ e impactar de forma determinante a história epidemiológica da população mundial²⁴. São dois os tipos de variações antigênicas, as menores ou *antigenic drift* e as variações maiores, denominadas *antigenic shift*. As variações *antigenic drift* são mais frequentes para os subtipos do vírus A, podendo ocorrer a cada dois ou três anos e, para os vírus do tipo B, a cada 5 ou 6 anos. As *antigenic drifts* ocorrem por mutações pontuais nos segmentos do genoma viral, resultando em mudanças nos aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície, especialmente a hemaglutinina. Este processo dá origem a novas variantes virais capazes de escapar da imunidade estimulada por infecção ou vacinação prévias. As variações antigênicas maiores estão associadas à completa substituição de um ou ambos segmentos do genoma viral, responsáveis pela produção de glicoproteínas de superfície. Tais alterações ocorrem por reagrupamento entre vírus humanos e vírus que infectam outras espécies animais e é facilitado pela segmentação do RNA viral, característica

que possibilita a recombinação entre o material genético de outros vírus influenza durante infecções mistas. Quando ocorrem as *antigenic shift*, a maioria da população não tem imunidade para os novos vírus e a doença dissemina-se rapidamente. As grandes pandemias foram consequências destas variações antigênicas maiores e responsáveis por milhões de mortes como nos episódios das Gripes Espanhola (1918-1919), Asiática (1957), e de Hong Kong (1968)^{4,11,25}.

O vírus influenza do tipo B, isolado pela primeira vez em 1940, apresenta uma estabilidade antigênica maior, quando comparado ao vírus influenza A, sendo menos frequentes as variações antigênicas. Já o vírus influenza C, descoberto em 1949, mostra-se o mais estável e, portanto, menos frequentemente envolvido em epidemias. Desta forma, os vírus A e B apresentam maior importância clínica. Estima-se que, em média, os vírus influenza A causem 75% das infecções, mas em algumas temporadas, ocorre predomínio do vírus influenza B. Os tipos A e B são responsáveis pelas epidemias sazonais e doenças respiratórias com duração de quatro a seis semanas que, frequentemente, estão associadas com o aumento nas taxas de hospitalização e morte por pneumonia, especialmente em pacientes considerados grupos de risco. O vírus C raramente causa doença grave^{4,11,25-26}.

O vírus influenza, ao penetrar o trato respiratório, se liga à superfície de células do epitélio colunar pelo sítio de ligação da hemaglutinina com o ácido siálico. Após infecção da célula, inicia-se um processo de intensa replicação viral que culmina em liberação de partículas por brotamento e infecção de células adjacentes nos epitélios respiratórios superior, bronquial e alveolar. Após 1 a 3 dias, um grande número de células entram em processo de necrose e liberação viral. Em casos extremos, é possível observar um maior dano epitelial, com ulcerações, hemorragias e formação de membrana hialina^{4,11}.

O vírus influenza é capaz de infectar, também, polimorfonucleares, linfócitos e monócitos e prejudicar funções celulares como quimiotaxia, fagocitose e proliferação, mas não pode completar seu ciclo replicativo nessas células. A liberação de novos vírus em humanos é praticamente restrita ao epitélio respiratório, em função da presença de proteases específicas que auxiliam na clivagem da Hemaglutinina. Durante seu processo replicativo, os vírus influenza misturam-se às secreções respiratórias e são disseminados por pequenas partículas de aerossol geradas durante o ato de espirrar, tossir, falar ou mesmo pelas mãos, que após contato com superfícies recém-contaminadas por secreções respiratórias podem levar o agente infeccioso direto a boca, olhos e nariz. As partículas

virais são detectáveis em 24 horas antes do início dos sintomas e decrescem até ficarem indetectáveis após 5 a 10 dias. Em crianças, no entanto, a liberação de vírus pode se prolongar em função da imaturidade do sistema imunológico. A resposta humoral se inicia dentro de 2 semanas após início da infecção, com produção de IgM, IgG e IgA neutralizantes para HA e NA. O IgG chega à mucosa por difusão passiva, enquanto IgA é produzido localmente e responsável por proteção pós-infecção. O IgG sistêmico garante a proteção pela vacina. A ação das citocinas varia entre cepas de espécies sazonais e pandêmicas^{4,9,27}.

4.2 A DOENÇA E GRUPOS DE RISCO

A gravidade da doença durante as epidemias e pandemias de influenza é bastante variável, causando desde quadros de leve rinite até pneumonia viral com complicações fatais. A presença de febre acompanhada de manifestações respiratórias, tais como coriza, dor de garganta e tosse somados a sintomas sistêmicos como dores musculares, calafrios ou fadiga auxiliam muito na distinção da influenza de outras infecções respiratórias como o resfriado comum, mas não são suficientemente específicos para se fazer um diagnóstico seguro sem confirmação laboratorial^{3,14,28}.

Os casos de influenza são classificados para fins de notificação, manejo clínico e investigação laboratorial, em Síndrome Gripal (SG), quando há febre de início súbito acompanhada por tosse ou dor de garganta com pelo menos um dos sintomas: mialgia, cefaléia e artralgia; e em Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG), caracterizada por sinais de gravidade e sintomas de febre, tosse e dispnéia, acompanhada ou não de aumento frequência respiratória e hipotensão²⁹⁻³⁰.

As manifestações clínicas da infecção pelo H1N1pdm09 são semelhantes aos da gripe sazonal porém há um maior comprometimento respiratório e em geral causa sintomas como calafrios, febre alta superior a 38°, dor de garganta, mialgia, forte cefaléia, tosse, fraqueza, desconforto geral e, em alguns casos, náusea, vômito, diarreia e ardor nos olhos^{3,14,28,30}.

Embora o quadro clínico dos casos de influenza sazonal seja inespecífico, com evolução clínica quase sempre benigna e autolimitada, têm-se observado casos com acometimento pulmonar grave, especialmente em grupos de risco como idosos, crianças, gestantes, indígenas, imunossuprimidos e portadores de comorbidades. Os óbitos geralmente estão relacionados a fatores como obesidade, asma, diabetes *mellitus* e doenças cardiovasculares^{4,28,31}.

De acordo com a OMS, cerca de 1,2 bilhões de pessoas apresentam risco elevado para complicações da influenza, sendo 385 milhões de idosos acima de 65 anos de idade, 140 milhões de crianças, e 700 milhões de crianças e adultos com doença crônica^{5,32}. Vários estudos provaram que gestantes têm alta susceptibilidade à infecção por influenza e risco aumentado de morbidade e morte durante epidemias sazonais e pandemias devido a mudanças cardiopulmonares adaptativas, aumento da frequência cardíaca, capacidade pulmonar reduzida e imunossupressão fisiológica, quadro que contribui para aumento da hipoxemia e gravidade da doença. Profissionais de saúde também são considerados grupo de risco por exposição a pessoas doentes e ambientes contaminados³¹⁻³⁴.

4.3 VIGILÂNCIA LABORATORIAL E EPIDEMIOLÓGICA

Devido às epidemias anuais de gripe e ao risco de novas pandemias, é de fundamental importância o monitoramento epidemiológico do vírus influenza³. Há uma ampla rede internacional de laboratórios sob coordenação e administração da Organização Mundial de Saúde (OMS), formando a Rede Mundial de Vigilância da Influenza^{32, 35-38}.

A Rede de vigilância epidemiológica da gripe, iniciada em 1947, inclui Laboratórios Nacionais de Influenza mundialmente distribuídos, apoiados por quatro Centros de Referência localizados em Londres, Atlanta, Melbourne e Tóquio³. Sua finalidade é fornecer anualmente informações necessárias para a escolha das variantes virais que farão parte da composição anual das vacinas contra influenza nos hemisférios norte e sul. Além disso, constituem uma vigilância oportuna para possibilitar uma rápida identificação de vírus influenza emergente com potencial de causar epidemias ou pandemias³⁷⁻⁴⁰.

No Brasil, o Sistema de Vigilância Sentinela de Influenza foi implantado em 2000 e desde 2011, o Ministério da Saúde vem desenvolvendo atividades para fortalecer a vigilância de influenza a fim de conhecer e acompanhar o comportamento epidemiológico dos vírus circulantes. O principal objetivo é a identificação dos vírus influenza e de outros vírus respiratórios circulantes⁴⁰⁻⁴¹. A vigilância da influenza no país é baseada nas informações geradas pela Rede de Vigilância em Influenza do Ministério da Saúde, da qual fazem parte a rede de laboratórios para vigilância de influenza constituída por 27 Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens), 3 Laboratórios de Referência Regional (LRR), sendo eles o Instituto Adolfo Lutz (IAL) em

São Paulo, Instituto Evandro Chagas (IEC) no Pará e a Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no Rio de Janeiro, que também acumula as atividades de Laboratório de Referência Nacional (LRN). Os LRR e LRN são responsáveis pelas análises complementares às realizadas pelos Lacen de sua abrangência^{29,30,40,41}.

Além disso, para ampliação da vigilância de influenza no Brasil foram definidos, em cada Unidade Federada, sítios sentinelas de atuação da vigilância epidemiológica da influenza para identificação e notificação de SG e SRAG, e atualmente, o Sistema de Vigilância Sentinela de Influenza é composto por 247 Unidades Sentinelas, sendo 142 unidades de SG e 105 unidades de SRAG. No Estado de São Paulo, a vigilância sentinela é formada por 22 unidades de SG e 8 unidades de SRAG de paciente internado em unidade de terapia intensiva (UTI) sediadas no município de São Paulo. Além do monitoramento de casos pelas unidades sentinelas, a vigilância da influenza também realiza notificação universal dos casos graves (SRAG), através do sistema SINAN Influenza Web^{5,29,30,40,41}.

De acordo com Informes Técnicos e Boletins Epidemiológicos publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde, entre os anos de 2009 a 2011 foram notificados mais de 100 mil casos de SRAG no país, dos quais 51.636 foram causados por H1N1pdm09 e aproximadamente 2,2% destes evoluíram a óbito. O maior número de casos por H1N1pdm09 ocorreu em 2009, sendo 70,2% dos casos de SRAG, enquanto que nos anos de 2010 e 2011 observou-se uma expressiva redução no número de casos, diminuindo para 20,3% e 14,6% respectivamente. Em 2011 houve aumento no registro de influenza sazonal, com pouco mais de 30% das notificações contra 11,3% de 2009 e 6,2% de 2010. Já os casos de influenza B aumentaram, de 0,1% em 2009 para 1,5% em 2010 e 2,2% em 2011⁴².

Em 2012, foram notificados 20.539 casos de SRAG, dos quais 4.016 foram causados pelo vírus influenza, destes 65% H1N1pdm09. Em 2013, foram confirmadas aproximadamente 6 mil infecções por influenza dentre as 36.134 notificações de SRAG, com predomínio do H1N1pdm09 (62,9%), seguidos de 22,5% por influenza B, 11,3% pelo H3N2 e 3,3% não subtipados^{43,44}.

Dados dos 2 últimos anos obtidos até a semana 47 de 2015, a proporção de casos SRAG causados pelo H1N1 declinaram de 465 em 2014 para 121 em 2015, e o vírus A(H3N2) causou mais de 50% das notificações de SRAG por Influenza nestes períodos. Os dados epidemiológicos do programa sentinela da SG, de 2014 a 2015, também demonstram um aumento na circulação de casos do vírus influenza A H3N2 seguido pelo vírus influenza B e diminuição de casos por A H1N1pdm09 de 226 (2014) para 136 (2015)^{45,46}.

O estado de São Paulo foi o segundo do país em número de notificações de SRAG causadas pelo H1N1pdm09 de 2009 a 2011. Em 2012, de um total de 4.355 hospitalizações por SRAG, 370 foram confirmadas para H1N1pdm09 e 304 para vírus sazonais A e B. No ano seguinte observou-se novamente um aumento no número de casos, com 1973 casos confirmados para H1N1pdm09, 154 por influenza A sazonal e 588 para o vírus influenza B^{42,43,47,48}.

Em 2014, foram contabilizados no estado de São Paulo, 117 casos de SRAG por H1N1pdm09 com evolução a óbito de 39% destes, 374 SRAG por Influenza A H3N2 com 11% de óbitos e 100 casos por influenza B com 17% de óbitos⁴⁵. Até a semana epidemiológica (SE) 52 de 2015, foram confirmados 33 casos SRAG por H1N1pdm09 com 10 óbitos, 190 SRAG por Influenza A H3N2 com 28 óbitos e 43 casos por influenza B com 10 óbitos⁴⁶.

4.4 IMUNIZAÇÃO

A vacinação é uma das medidas mais efetivas para a prevenção da influenza e suas complicações, podendo reduzir até 70% das hospitalizações e 80% dos óbitos entre idosos⁴⁹. Esta intervenção preventiva, é considerada uma importante estratégia de controle por contribuir de maneira efetiva na redução das internações hospitalares, gastos com medicamentos e mortes evitáveis^{5,50,51}.

No Brasil, a vacinação contra a gripe, iniciada em 1999, era destinada apenas as pessoas com 65 anos ou mais, sendo reduzida para 60 anos a partir de 2000. Entre os anos de 1999 e 2010, a vacinação para influenza sazonal estava disponível apenas para idosos e alguns grupos de risco. Gradualmente, outros grupos prioritários foram incluídos e na campanha de vacinação de 2014, o público-alvo beneficiado representou aproximadamente 49,6 milhões de pessoas, sendo contemplados trabalhadores de saúde, povos indígenas nativos, crianças de 6 meses a 5 anos de idade, gestantes e puérperas até 45 dias após o parto, pessoas com doenças crônicas não-transmissíveis e outras condições clínicas especiais (com prescrição médica), e também de internos e funcionários do sistema prisional de acordo com Plano Nacional de Saúde no Sistema Penitenciário, 2.^a edição/ Brasília-DF 2005 e a NOTA TÉCNICA 121 SISPE/DAPES/SAS – PNI/SVS/MS – DEPEND/MJ de 01 de agosto de 2011 e Portaria Interministerial nº 1, de 2 de janeiro de 2014^{5,50,51}.

Durante epidemia da influenza sazonal, pandemias anteriores e a pandemia pela influenza A (H1N1)pdm09, a gravidez expôs mulheres saudáveis ao ris-

co aumentado para morbidade e mortalidade, reforçando a necessidade da vacinação⁵². A vacinação de gestantes é considerada prioritária pela OMS, pois beneficia mães e bebês, especialmente os menores de seis meses de idade que não podem receber a vacina⁵. Em gestantes, especialmente no terceiro trimestre de gestação, há um alto risco de complicações, mantendo-se elevado no primeiro mês após o parto^{5,53-55}. Assim, considerando que as puérperas apresentam risco semelhante ou maior que gestantes de ter complicações em decorrência da influenza, desde 2013 no Brasil, puérperas de até 45 dias após parto, foram incluídas no grupo alvo de vacinação^{5,41}.

Após estudos epidemiológicos, os adultos entre 20 a 39 anos de idade foram contemplados com doses de vacina contra a influenza ainda em 2010, e crianças com idade inferior a 9 anos vacinadas pela primeira vez, devem receber duas doses da vacina para serem consideradas imunizadas, administradas a intervalos de 3 semanas a 30 dias entre uma e outra⁵⁶. Já os profissionais de saúde estão incluídos nos grupos prioritários para vacinação não apenas para sua proteção individual, mas também para evitar a transmissão dos vírus aos pacientes de alto risco^{8,5,41,53-56}.

As variantes do vírus influenza coletadas em diversas regiões do mundo, que farão parte da composição das vacinas, são classificadas e catalogadas por um código oficial da OMS, seguindo os seguintes critérios: tipo antigênico da nucleoproteína central; hospedeiro de origem (quando não especificado o vírus tem origem humana); localização geográfica do primeiro isolamento; número laboratorial da cepa, atribuído de acordo com a ordem cronológica na qual a cepa foi isolada em determinada localidade e por fim, ano de isolamento. Além disso, para o vírus influenza tipo A, os subtipos de hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) são discriminados entre parênteses. Desta forma, a cepa A/Sydney/5/97 (H3N2) é uma variante do tipo A, de origem humana, isolada na cidade de Sydney em 1997, com antígenos de superfície H3 e N2^{3,32,37,38}.

A recomendação para a composição da vacina trivalente contra gripe, desde de 1977, inclui três variantes do vírus influenza, sendo duas do tipo A (H1N1 e H3N2) e uma do tipo B, que são escolhidas anualmente visando prevenir a doença causada por cepas que circularão na temporada seguinte^{5,32}. Na temporada 2015, o Núcleo de Doenças Respiratórias do Centro de Virologia/IAL, integrante da Rede Nacional de Vigilância da Influenza e da *Global Influenza Surveillance Network* (GISN), identificou a circulação das variantes virais: A/California/07/2009 - LIKE (H1N1)pdm09; B/Puket/3073/2013 - LIKE (linhagem Yamagata); A/Switzerland/9715293/2013 - LIKE (H3N2), que estão

contempladas na composição da vacina trivalente utilizada no Hemisfério Sul, em 2015³⁰.

As novas vacinas quadrivalentes licenciadas em 2015, com base em estudos de imunogenicidade e segurança, contemplaram além das três linhagens recomendadas para a composição das vacinas, uma segunda cepa B da linhagem Victoria (B/Brisbane/60/2008). As vacinas quadrivalentes são inativadas e produzidas sem adjuvantes. Sua utilização pode garantir um maior espectro de proteção vacinal já que a co-circulação das duas linhagens de influenza B desde o ano 2000 tornou a proteção pela cepa vacinal ineficiente em 50% das vezes, considerando que a linhagem B contida na vacina não coincidiu com a que predominava em uma temporada. Porém, essas vacinas só estiveram disponíveis em clínicas privadas de imunização e a Sociedade Brasileira de Imunizações - SBIM aconselha que, na indisponibilidade da vacina quadrivalente, a vacina trivalente seja administrada, especialmente em grupos de maior risco para as formas graves de gripe³⁶.

As estratégias de vacinação no Brasil, a inclusão de novas vacinas no Programa Nacional de Imunizações e o estabelecimento de grupos populacionais são respaldadas em bases técnicas, científicas, evidência epidemiológica, entre outros, visando minimizar a ocorrência da doença, complicações com consequentes internações e óbitos que são atribuíveis ao vírus influenza⁵. Desde 2013 foram mais de 35 milhões de doses da vacina aplicadas aos grupos elegíveis, sendo que todos atingiram a meta de 80% de cobertura vacinal. Em 2015 foram enviadas ao estado de São Paulo 11.854.100 dentre as 49.639.700 distribuídas no país todo⁵.

Entretanto, cabe ressaltar que ações de prevenção cotidianas são também muito eficazes, tais como: higienização das mãos com água e sabão ou à base de álcool, evitar contato próximo com pessoas doentes, cobrir o nariz e a boca com um lenço de papel quando tossir ou espirrar, não trabalhar com sintomas de síndrome gripal e evitar aglomerações e locais fechados^{4,35}.

4.5 TESTES LABORATORIAIS PARA O DIAGNÓSTICO DA INFLUENZA

Além da sua importância na definição do manejo terapêutico dos pacientes, os testes laboratoriais se tornaram ferramentas importantes para a Saúde Pública, sendo fundamentais para a vigilância, contenção e prevenção dos vírus circulantes⁵⁷. Os testes envolvem técnicas sorológicas, moleculares e de cultivo e isolamento viral.

4.5.1 ESPÉCIMES CLÍNICOS

O material biológico ideal para diagnóstico deve ser derivado do trato respiratório do paciente. Aspirados nasofaríngeos (ANF) são mais adequados por possuírem maior teor celular que os *swabs* nasofaríngeos (SNF) para isolamento viral. Os *swabs* e as lavagens de garganta são de uso limitado no diagnóstico de influenza, pelo fato da maior parte das células presentes neste material serem do epitélio escamoso⁵⁸. O sítio anatômico da infecção no trato respiratório, o uso prévio de antivirais, e principalmente o início dos sintomas devem ser considerados, sendo recomendada coleta de até 5 dias para realização de Imunofluorescência ou testes rápidos para detecção de antígenos e até 7 dias para reações baseadas na amplificação do material genético viral, como a RT-PCR⁵⁹.

4.5.2 MÉTODOS SOROLÓGICOS

Inibição de Hemaglutinação e Microneutralização

Testes de Inibição da Hemaglutinação e Microneutralização são ferramentas auxiliares da epidemiologia e estudos imunológicos, bem como da avaliação da atividade imunogênica da vacina³⁷. O princípio destes ensaios baseia-se na propriedade do vírus Influenza de aglutinar hemácias pela ligação da hemaglutinina aos resíduos de ácido siálico na membrana eritrocitária de aves ou mamíferos e na neutralização do vírus evitando seu efeito citopático nas células estudadas. Os anticorpos específicos para o antígeno HA, quando presentes, inibem essa capacidade de hemaglutinação ou impedem os vírus de infectar células saudáveis MDCK (Madin-Darby canine kidney) neutralizando-os⁶⁰. Inibição da Hemaglutinação é altamente confiável para tipagem, subtipagem e reconhecimento de características antigênicas adicionais de isolados de vírus Influenza. Porém, apresenta como desvantagens a necessidade de remover inibidores naturais no soro e a necessidade de padronizar antígenos sempre que um teste é feito^{37,61}.

O ensaio de Microneutralização utiliza placas de microtitulação em combinação com o ensaio imunoenzimático para detectar as células infectadas e pode produzir resultados em até dois dias. É muito sensível para detectar anticorpos específicos contra o vírus Influenza em soro de humanos e animais, incluindo a detecção de anticorpos humanos contra os subtipos aviários. Este teste pode ser utilizado logo que um novo vírus é identificado e frequentemente antes das proteínas virais purificadas se tornarem disponíveis para outros ensaios^{37,62}.

Testes rápidos para detecção de antígenos

Os testes rápidos de antígenos ou *kits* comerciais de detecção de proteínas conhecidos como *point of care* foram muito importantes na epidemia de 2009, pois o primeiro caso de influenza pandêmico diagnosticado nos Estados Unidos foi detectado pelo teste rápido. Após a disseminação do vírus, os testes rápidos foram utilizados em vários locais, antes e depois da disponibilização de ensaios moleculares mais sensíveis para a detecção do novo vírus e sua alta especificidade e valor preditivo durante o pico da epidemia permitiu encurtar a espera pelo tratamento e cuidado ao paciente. No Brasil têm custo elevado e isso limita sua utilização. A sensibilidade dos testes rápidos disponíveis comercialmente varia muito, portanto resultados negativos não afastam suspeita diagnóstica, não direcionam terapias e nem suspendem medidas de contenção^{37,58,63}.

Identificação do vírus por Imunofluorescência

A marcação de anticorpos com fluoróforos e sua ligação a células infectadas é um método rápido e sensível para diagnosticar infecções virais. Esta metodologia permite detecção de células epiteliais infectadas fixadas em lâminas e os antígenos virais presentes são detectados por anticorpos específicos conjugados a corantes fluorescentes (imunofluorescência direta) ou detectados por anti-anticorpos ligados a um corante fluorescente (imunofluorescência indireta). Em ambos os casos as reações são visualizadas com auxílio de um microscópio de fluorescência e células positivas são reconhecidas pela intensidade da cor e morfologia. A imunofluorescência indireta permite utilizar um pool de anti-soros para infecções virais e um único anti-anticorpo conjugado a um corante fluorescente. Essa vantagem garante a identificação dos vírus influenza A e B, parainfluenzas, vírus respiratório sincicial e adenovírus por um painel de anticorpos monoclonais, e faz deste o método de escolha para os centros laboratoriais de vigilância sentinela dos vírus respiratórios⁵⁹.

A imunofluorescência direta é descrita como uma técnica que apresenta um melhor resultado para o diagnóstico do H1N1pdm09, todavia o diagnóstico de infecção não poderá ser definido por um resultado negativo na IFD, ou mesmo em testes rápidos. Em casos como esse, a OMS recomenda que sejam feitos outros ensaios em conjunto com a imunofluorescência, como o exame de transcrição reversa da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) para confirmação ou exclusão diagnóstica^{37,58,63}.

4.5.3 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS

Detecção e amplificação do RNA viral: RT-PCR convencional ou *real time* e ensaios multiplex

O desenvolvimento de técnicas de RT-PCR permitiu o diagnóstico rápido e seguro da infecção pelo vírus influenza A através da detecção de sequências do genoma viral. Nesse processo, o RNA purificado do vírus Influenza é transcrito reversamente em cDNA e posteriormente amplificado com *primers* específicos. A subtipagem molecular de um vírus desconhecido é difícil devido à alta frequência de regiões variáveis nas sequências gênicas das hemaglutininas e neuraminidases. A RT-PCR degenerada é uma ferramenta poderosa para encontrar novos genes e alinhar as sequências de genes relacionados, contribuindo também para subtipagem dos novos vírus^{37,64}.

Com a emergência do H1N1pdm2009, o PCR *real time* (qPCR) tornou-se o ensaio primário para seu diagnóstico e vigilância, devido sua alta sensibilidade, boa reprodutibilidade, ampla faixa de quantificação e potencial para triagem de um grande número de amostras. Por diferenças entre as sequências gênicas dos diferentes tipos e subtipos de vírus Influenza há possibilidade de sintetizar iniciadores e sondas específicas para distingui-los. Genes que codificam proteínas internas do vírus como a proteína de matriz M1 e a proteína não estrutural NS1 são altamente conservadas no genoma e são alvos úteis para a detecção universal e diferenciação dos vírus Influenza A e B. A reação de PCR Multiplex detecta, simultaneamente, mais de um alvo de DNA utilizando vários pares de iniciadores e sondas com fluoróforos diferentes em um único tubo de reação. Combinado com RT-PCR o qPCR tem sido bem utilizado na detecção, tipagem e subtipagem do vírus da Influenza^{37,64}.

Outras Técnicas Moleculares

A tecnologia do DNA microarray, contendo oligonucleotídeos, sondas ou DNAs marcados pode ser utilizada para triar milhões de sequências de DNA diferentes simultaneamente. É uma maneira de identificar e subtipar o vírus da influenza A durante a vigilância. O pirosequenciamento tem sido utilizado para a genotipagem, sequenciamento de DNA com estruturas secundárias e, também, para a rápida detecção de marcadores moleculares de resistência aos bloqueadores dos canais de íons M2 e inibidores de NA no vírus influenza, mas é limitado para sequenciamentos genômicos^{37,64}.

4.5.4 ISOLAMENTO DE VÍRUS

O isolamento viral é um procedimento sensível e útil no diagnóstico da infecção viral desde que a amostra clínica seja de qualidade e o período de coleta esteja adequado. O vírus pode ser cultivado em cultura de células e em ovos embrionados. As linhagens celulares mais utilizadas para a inoculação dos vírus Influenza são as células caninas MDCK e os procedimentos padrão de isolamento requerem de 4-5 dias até a liberação dos resultados. Alguns ensaios rápidos de cultura celular que detectam antígenos virais se tornaram disponíveis e resultados podem ser obtidos de 18-40 horas, onde a replicação do vírus influenza é detectada pela observação do efeito citopático (EC) ou da expressão da hemaglutinina viral (HA) na superfície das células infectadas. Ambos são métodos trabalhosos e, além disso, as células cultiváveis disponíveis suportam a replicação de um número limitado de vírus respiratórios, sendo necessário manter várias linhagens de células para detectar uma maior variedade de patógenos respiratórios³⁷.

Apesar de a inoculação em ovos ter sido ultrapassada pela cultura celular, esta permanece sendo o melhor método para a geração rápida de títulos muito elevados de vírus adequados à produção da maioria das vacinas. O isolamento viral em ovos embrionados ou em culturas de células com sua posterior identificação por técnicas imunológicas, genéticas ou por microscopia eletrônica é o método padrão ouro para o diagnóstico viral³⁷.

Vários fatores como sensibilidade, especificidade, tempo de liberação, reprodutibilidade, facilidade e custos de execução precisam ser considerados para decidir quais testes de diagnóstico utilizar. Geralmente, a RT-PCR é mais sensível que a sorologia e cultura (sensibilidade da cultura celular é amplamente dependente do laboratório onde é realizado) e a sorologia possui custo menor quando comparada a RT-PCR, mas devido à necessidade de soro em fase aguda e convalescente o diagnóstico final é tardio^{37,63,65}.

4.6 ANTIVIRAIS

A imunização é a melhor forma de prevenção contra a infecção pelo vírus da gripe, porém, a terapia antiviral possui um papel muito importante, especialmente por prevenir complicações sérias. Existem duas classes de drogas licenciadas para o tratamento e profilaxia do vírus Influenza: inibidores de canais iônicos M2 (amantadine e rimantadine) e inibidores

de neuraminidases (oseltamivir e zanamivir)⁶⁶. Outro inibidor da neuraminidase em estudo nos EUA é o Peramivir, para uso endovenoso nos casos de falha do tratamento oral.

Atualmente todas as cepas circulantes de influenza nos Estados Unidos são resistentes a pelo menos duas das maiores classes de drogas anti-influenza e, devido a essa rápida emergência de cepas resistentes, em 2006 o CDC recomendou que os adamantanes não deveriam ser utilizados para o tratamento e profilaxia de Influenza. Os dois inibidores de neuraminidases disponíveis se tornaram as únicas drogas recomendadas para o tratamento e profilaxia de Influenza A e B. O tratamento precoce com estas drogas reduz a gravidade e sintomas da gripe e suas complicações associadas. Cuidados como controle da febre, alívio da dor e hidratação, bem como identificar e tratar quaisquer infecções secundárias ou outros problemas médicos também são fundamentais⁶⁶⁻⁶⁷.

No Brasil, o Ministério da Saúde preconiza que em indivíduos adultos e crianças com mais de 40 quilos, com manifestações clínicas compatíveis com SRAG, seja administrado imediatamente o medicamento Oseltamivir, preferencialmente em até 48 horas do início dos sintomas, em doses de 75 mg duas vezes ao dia, por cinco dias, além de avaliação e monitoramento clínico constante e confirmação laboratorial. Para crianças acima de um ano de idade, com menos de 40 kg, as doses variam entre 30 mg e 60 mg também durante 05 dias. O protocolo de Manejo Clínico e Tratamento da Influenza, elaborado em 2015, orienta que gestantes e puérperas, vacinadas ou não, devem ser tratadas com o fosfato de oseltamivir mesmo se não apresentarem sinais de gravidade, pois o mesmo não oferece riscos durante a gestação. São elegíveis para tratamento também, os indivíduos com SG que apresentem condição ou fatores de risco para agravamento da doença^{8,68-69}.

O início rápido do tratamento aumenta sua eficácia, tanto na redução da sintomatologia quanto de complicações, porém os benefícios do tratamento são consideráveis mesmo de 3 a 4 dias após início da doença. A quimioprofilaxia não é recomendada, exceto em situação de indivíduo exposto ao vírus e portador de fator de risco para complicações. Em casos de resistência ao oseltamivir é indicado o zanamivir, porém sua utilização somente é autorizada em casos de impossibilidade clínica da manutenção do uso do fosfato de oseltamivir. Estes medicamentos estão disponíveis no Sistema Único de Saúde – SUS e devem ser prescritos em receituário simples. Os pacientes com SG devem ser orientados a retornar ao serviço de saúde em caso de agravamento do quadro clínico

para serem reavaliados quanto aos critérios de SRAG ou sinais de gravidade^{8,68,69}.

A emergência da resistência a oseltamivir entre os vírus sazonais A (H1N1) no final de 2007 ao início de 2008 tem tornado essencial, para a vigilância, a realização de teste de suscetibilidade à inibição da neuraminidase entre os vírus influenza circulantes no mundo todo^{64,70}. Monitorar as mutações que conferem esta resistência antiviral é muito importante para a epidemiologia de saúde pública mundial e o preparo para uma nova epidemia^{37,66,71}.

5. NOVOS DESAFIOS

Os vírus influenza continuam sendo um grande desafio para Saúde Pública mundial, devido sua natureza imprevisível que demanda contínua vigilância epidemiológica para o desenvolvimento de estratégias profiláticas e preventivas. Desta forma, inferimos a necessidade de maiores esforços de saúde pública no acompanhamento da circulação do vírus em regiões com poucos recursos e o reforço do diagnóstico laboratorial, que são ferramentas essenciais e permitirão identificar e controlar os vírus emergentes com elevada capacidade de disseminação e alta letalidade.

Além disso, o monitoramento da resistência do vírus influenza aos antivirais disponíveis também é de extrema importância. Pesquisas para desenvolver terapias que envolvam o uso de múltiplos antivirais pode ser uma estratégia adequada para reduzir o aparecimento de resistências. Outras proteínas antigênicas do vírus também são opções alvo no desenvolvimento de novos fármacos, e diversos ensaios clínicos estão sendo realizados em grandes centros de pesquisa.

A vacinação permanece como uma das medidas mais efetivas para prevenção da gripe e suas complicações. Mas apesar de todos os avanços, muitas questões precisam ser respondidas e resolvidas, como a necessidade da vacina estar à frente das linhagens emergentes e, para isto, estudos de vacinas contra antígenos conservados do vírus influenza, que permitam ao organismo uma resposta imune potencial contra todos os sorotipos estão em desenvolvimento.

Apesar de todos os esforços, apenas a notificação precoce de casos pode reduzir o alcance de uma epidemia e o contínuo monitoramento é necessário para a detecção de quaisquer variantes antigênicas e entendimento de sua sazonalidade.

REFERÊNCIAS

1. Cox NJ, Fukuda K. Influenza. *Infect Dis Clin North Am.* 1998;12:27-38.
2. Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet.* 1999;354(9186):1277-82.
3. Forleo-Neto E, Halker E, Santos VJ, Paiva TM, Toniolo-Neto J. Influenza. *RevSocBrasMed Trop.* 2003;36(2):26-74.
4. Caneiro M, Trench FJP, Waib LF, Pedro FL, Motta F. Influenza H1N1 2009: revisão da primeira pandemia do século XXI. *Rev AMRIGS [Internet].* 2010 [Acesso 2015 ago 03];54(2):206-213. Disponível em: http://www.amrigs.com.br/revista/54-02/18-637_influenza.pdf
5. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Imunizações. Informe Técnico "Campanha Nacional de Vacinação contra Influenza 2015". Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
6. Greco DB, Tupinambás U, Fonseca M. Influenza A (H1N1): histórico, estado atual no Brasil e no mundo, perspectivas. *RevMed Minas Gerais.* 2009;19(2):132-9.
7. Imai M, Kawaoka Y. The role of receptor binding specificity in interspecies transmission of influenza viruses. *Cur Opin Virol [Internet].* 2012 [cited 2015 Aug 15];2(2):160-7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22445963>
8. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de tratamento de Influenza: 2013. Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
9. Auerbach P, Oselame GB, Dutra DA. Revisão histórica da gripe no mundo e a nova H7N9. *RevMed Saúde de Brasília.* 2013;2(3):183-97
10. Oliveira E, Amorim R, Barioto JG; Barbosa F. Gonçalves, AC. H1N1: revisão literária a respeito do histórico da existência do vírus e seu impacto na atualidade. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.* 2013;7(1):97-108.
11. Wright PF, Webster RG. Orthomyxoviruses. In: *Fields Virology.* 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
12. World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009 – update 106 [Internet]. WHO; 2013.[cited 2015 Sept 07]. Available from: http://www.who.int/csr/don/2010_06_25/en/index.html
13. Centers for Disease Control and Prevention. Estimates of 2009 H1N1 Influenza cases, hospitalizations and deaths in the United States, April – December 12, 2009 [Internet]. CDC; 2010.[cited 2015 Sept 07]. Available from: http://www.cdc.gov/h1n1flu/estimates/April_December_12.htm

14. Brehmer LCF, Trindade LL, Ramos FRS, Pires DEP, Santos SMA, Meirelles BHS. Revisão integrativa da literatura sobre a *Influenza A H1N1*. *Texto Contexto Enferm*. 2011;20(Esp): 272-7.
15. Dias RF. Ensaio molecular para vigilância epidemiológica de gripe com ênfase no diagnóstico de influenza A H1N1. [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2011.
16. Sekkides O. Pandemic influenza—a timeline. *Lancet Infect Dis*. 2010 Oct;10(10):663
17. World Health Organization. H1N1 in post-pandemic period. Director-General's opening statement at virtual press conference 10 August 2010. WHO; 2010. [cited 2016 Feb 02] Available from: http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2010/h1n1_vpc_20100810/en/
18. Centers for Disease Control and Prevention. Types of influenza viruses [Internet]. Atlanta: CDC; 2015. [cited 2015 Sept 07]. Available from: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
19. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.
20. Chaves TSS. Influenza A H1N1 (Influenza Suína). In: Veronesi R, Focaccia R. *Tratado de infectologia*. 4a edrev atual. São Paulo: Ed Atheneu; 2009.p.2249-56.
21. Yorck I, Donis RO. The 2009 pandemic influenza virus: Where did it come from, where is it now, and where is it going? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;370:241-57. doi: 10.1007/82_2012_221.
22. Murcia PR, Hughes J, Battista P, Lloyd L, Baillie GJ, et al. Evolution of an Eurasian avian-like influenza virus in naive and vaccinated pigs. *PLoS Pathog*. 2012;8(5):e1002730. doi:10.1371/journal.ppat.1002730
23. Fuller TL, Gilbert M, Martin V, Cappelle J, Hosseini P, Njabo KY, et al. Predicting hotspots for influenza virus reassortment. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2013 Apr [cited 2016 Feb 02];19(4):[about 1 p.]. Available from: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/19/4/12-0903_article
24. Octaviani CP, Ozawa M, Yamada S, Goto H, Kawaoka Y. High level of genetic compatibility between Swine-Origin H1N1 and Highly Pathogenic Avian H5N1 Influenza Viruses. *J Virol*. 2010 Oct;84(20):10918-22. doi: 10.1128/JVI.01140-10
25. Lobo RD. Fatores de risco para aquisição de Influenza A (H1N1) pdm09 entre profissionais de saúde [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2015.
26. Dolin R. Influenza. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al (Eds). *Harrison's principles of internal medicine*. New York: Mcgraw Hill; 2008.p. 1127.
27. Rossman JS, Lamb RA. Influenza virus assembly and budding. *Virology*. 2011 Mar;411(2):229–36. doi: 10.1016/j.virol.2010.12.003.
28. Rossetto EV, Luna EJ. Aspectos clínicos dos casos de influenza A(H1N1)pdm09 notificados durante a pandemia no Brasil, 2009-2010. *Einstein*. 2015;13(2):177-82.
29. Governo do Estado (SP), Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”, Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. *Boletim Informativo. Síndrome Respiratória Aguda Grave – SRAG / Influenza – SE37/2013*. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde; 2013.
30. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. *Boletim Informativo – Influenza Semana Epidemiológica (SE) 29/2015* [Internet]. Brasília; 2015. [acesso 2015 jul 11]. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=40503
31. Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2001 Apr.;50(RR-4):1-46.
32. World Health Organization. Global Alert and Response (GAR). *Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)* [Internet]. Geneva: WHO; 2015 [cited 2015 July 13]. Available from: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/en/index.html
33. Siston AM, Rasmussen SA, Honein MA, Fry AM, Seib K, Callaghan WM, et al. Pandemic 2009 Influenza A(H1N1) virus illness among pregnant women in the United States. *JAMA* [Internet]. 2010 Apr [cited 2015 Aug 18];303(15):1517-25. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=185713>
34. Rasmussen SA, Jamieson DJ, Uyeki TM. Effects of influenza on pregnant women and infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2012; 207(3):S3-S8. doi:10.1016/j.ajog.2012.06.068
35. Pitts SI, Maruthur NM, Millar KR, Perl TM, Segal J. A systematic review of mandatory influenza vaccination in healthcare personnel. *Am J Prev Med*. 2014;47(3):330-40.
36. Sociedade Brasileira de Imunização. *Vacinas Influenza no Brasil em 2015* [Internet]. São Paulo: SBIM; 2015 [acesso 2015 Ago 18]; 5p. Disponível em: http://www.sbim.org.br/wpcontent/uploads/2015/03/nota_tecnica_influenza
37. World Health Organization. *Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza* [Internet]. Geneva: WHO; 2011. [cited 2015 Aug 11]. Available from: http://www.who.int/publications/2011/9789241548090_eng.pdf
38. World Health Organization. *Global epidemiological surveillance standards for influenza* [Internet]. Geneva: WHO;

- 2013.[cited 2015 Aug. 11]. Available from: http://www.who.int/influenza/resources/documents/WHO_Epidemiological_Influenza_Surveillance_Standards_2014.pdf
39. Grohskopf LA, Olsen SJ, Sokolow LZ, Bresee JS, Cox NJ, Broder KR, Karron RA, Walter EB, Centers for Disease Control and Prevention. Prevention and control of seasonal influenza with vaccines: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP) - United States, 2014-15 influenza season. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2014 Aug;63(32):691-7.
 40. Freitas FT. Sentinel surveillance of influenza and other respiratory viruses, Brazil, 2000-2010. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(1):62-8.
 41. Governo do Estado (SP), Secretaria de Estado da Saúde, Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac". Informe Técnico Influenza 2014 [Internet]. São Paulo: CVE; 2014. [acesso 2015 Abr 24] Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/2014/IF14_INFLUJAN.pdf>
 42. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe Técnico Influenza 2012 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2012. [acesso 2016 Fev 05] Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/22/informe-influenza-2009-2010-2011-220514.pdf>>.
 43. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Informativo – Influenza (Gripe) - Semana Epidemiológica (SE) 52/2012 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. [acesso 2016 Fev 05] Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/22/boletim-influenza-se52de2012-220514.pdf>>.
 44. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Influenza: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 52/2013 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2013. [acesso 2016 Fev 07] Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/22/boletim-influenza-se52de2013-220514.pdf>>.
 45. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Influenza: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 53/2014 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2014. [acesso 2016 Fev 07] Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/06/Boletim-Epidemiologico-Influenza-SE53-2014.pdf>>.
 46. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Influenza: monitoramento até a Semana Epidemiológica (SE) 52/2015 [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. [acesso 2016 Mar 04] Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/04/Boletim-Epidemiologico-Influenza-SE52-2015-completo.pdf>>.
 47. Governo do Estado (SP), Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. Informe Técnico. Situação Epidemiológica da SRAG/Influenza. Vigilância Sentinela da Influenza. São Paulo: DDTR; 2013.
 48. Governo do Estado (SP), Secretaria de Estado da Saúde, Coordenadoria de Controle de Doenças, Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac", Divisão de Doenças de Transmissão Respiratória. Informe Técnico. Situação Epidemiológica da SRAG/Influenza. Vigilância Sentinela da Influenza. São Paulo: DDTR; 2014.
 49. Gomes AA, Nunes MAP, Oliveira CCC, Lima SO. Doenças respiratórias por influenza e causas associadas em idosos. *Cad. Saúde Pública.* 2013 Jan;29(1):117-22. doi: 10.1590/S0102-311X2013000100014
 50. Cantarino L, Merchan-Hamann E. Influenza in Brazil: surveillance pathways. *J Infect Dev Ctries.* 2016;10(1):13-23. doi:10.3855/jidc.7135
 51. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Programa Nacional de Imunizações. Informe Técnico "Campanha Nacional de Vacinação contra Influenza 2014". Brasília: Ministério da Saúde; 2014.
 52. Ribeiro AF, Pellini ACG, Kiatagawa BY, Marques D, Madalosso G, Figueira GCN *et al.* Risk factors for death from influenza A(H1N1)pdm09, State of São Paulo, Brazil, 2009. *PLoS One.* 2015;10(3):e0118772.
 53. Olson DR, Heffernan RT, Paladini M, Konty K, Weiss D, Mostashari F. Monitoring the impact of influenza by age: emergency department fever and respiratory complaint surveillance in New York City. *PLoS Med.* 2007;4(8):e247.
 54. Nichol KL, Nordin J, Mullooly J, Lask R, Fillbrandt K, Iwane M. Influenza vaccination and reduction in hospitalizations for cardiac disease and stroke among the elderly. *N Engl J Med.* 2003;348:1322-32.
 55. Mullooly JP, Bennett MD, Hornbrook MC, Barker WH, Williams WW, Patriarca PA *et al.* Influenza vaccination programs for elderly persons: cost-effectiveness in a health maintenance organization. *Ann Intern Med.* 1994 Dec;121(12):947-52.
 56. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis, Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações. Nota de esclarecimento sobre a Estratégia de vacinação da influenza pandêmica (H1N1) 2009, iniciada no dia 08 de março/2010. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.
 57. Mello WA. O papel do diagnóstico laboratorial da influenza. *Rev Pan-AmazSaúde.* 2010;1(1):191-3.
 58. Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W. Influenza report 2006 [Internet]. Paris: Flying Publisher; 2006 [cited 2015 July

- 22]. Available from: <http://www.influenzareport.com/influenzareport.pdf>
59. Bellei N, Melchior TB. H1N1: pandemia e perspectiva atual. *J BrasPatolMed Lab.* 2011;47(6):611-17.
 60. Ohmit SE, Petrie JG, Cross RT, Johnson E, Monto AS. Influenza hemagglutination inhibition antibody titer as a correlate of vaccine-induced protection. *J Infect Dis.* 2011;204(12):1879-85.
 61. Papenburg J, Baz M, Hamelin MÈ, Rhéaume C, Carbonneau J, Ouakki M, Rouleau I, De Serres G, Boivin G. Evaluation of serological diagnostic methods for the 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus. *Clin Vaccine Immunol.* 2011;18(3):520-2.
 62. Mittelholzer CM, Brokstad KA, Pauksens K, Jonsson R, Brytting M, Linde A. Human cell lines used in a micro neutralization test for measuring influenza-neutralizing antibodies. *Scand J Immunol.* 2006;63(4):257-63.
 63. Kumar S, Henrickson KJ. Update on influenza diagnostics: lessons from the novel H1N1 influenza A pandemic. *ClinMicrobiol Rev.* 2012;25(2):344-61.
 64. Wang R, Taubenberger JK. Methods for molecular surveillance of influenza. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;8(5):517-27.
 65. Schmid ML, Kudesia G, Wake S, Read RC. Prospective comparative study of culture specimens and methods in diagnosing influenza in adults. *BMJ.* 1998;316:275. doi: 10.1136/bmj.316.7127.275
 66. Bright RA, Shay DK, Shu B, Cox NJ, Klimov AI. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005-2006 influenza season in the United States. *JAMA.* 2006;295(8):891-4.
 67. Rewar S. Swine-origin Influenza A (H1N1) virus: as pandemic infection. *WJPR.* 2015;4(6):514-30.
 68. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Gabinete Permanente de Emergências em Saúde Pública. ESPII. Protocolo de manejo clínico e vigilância epidemiológica da Influenza. Versão III. Agosto de 2009. [Internet]. Brasília: Ministério da Saúde; 2009. [Acesso 2016 Fev 08] Disponível em: <http://www.fonoaudiologia.org.br/publicacoes/protocolo_de_manejo_clinico_05_08_2009.pdf>
 69. Ministério da Saúde (BR), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de tratamento de Influenza: 2015. Brasília: Ministério da Saúde; 2015.
 70. Oliveira E, Amorim R, Barioto JG, Barbosa F, Gonçalves AC. H1N1: revisão literária a respeito do histórico da existência do vírus e seu impacto na atualidade. *Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde.* 2013;17(1):97-108.
 71. Centers for Disease Control and Prevention. Antiviral agents for the treatment and chemoprophylaxis of Influenza: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*[Internet]. 2011 Jan [cited 2015 June 15];60(1)1-24. Available from: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr6001a1.htm>