



Vigilância da gripe em Portugal no inverno 2013/2014

Paula Cristóvão¹, Pedro Pechirra¹, Patrícia Conde¹, Ana Carina Maia¹, Carla Roque², Dina Carpinteiro³, Daniel Ataíde Sampaio³, Baltazar Nunes⁴, Raquel Guiomar¹

raquel.guiomar@insa.min-saude.pt

(1) Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(2) Laboratório de Cultura de Tecidos. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

(3) Unidade de Tecnologia e Inovação. Departamento de Genética Humana, INSA.

(4) Departamento de Epidemiologia, INSA.

Sistema de vigilância

O vírus influenza é o agente da gripe, uma doença respiratória sazonal, que ocorre frequentemente nos meses de outono e inverno. Todos os anos são atribuídos ao vírus influenza um número elevado de óbitos especialmente na população mais idosa e em indivíduos com doenças crónicas graves, e um menor número de casos de morte em crianças e adultos jovens ⁽¹⁾.

O Programa Nacional de Vigilância da Gripe (PNVG) tem como principais objetivos a recolha, análise e divulgação da informação sobre a atividade da gripe em Portugal, pretendendo desta forma contribuir para a diminuição da morbidade e mortalidade associada à gripe e suas complicações, permitindo a orientação das medidas de controlo e de prevenção da doença.

O PNVG integra as componentes da vigilância clínica e laboratorial possibilitando a determinação semanal das taxas de incidência de síndrome gripal (SG), a identificação e caracterização das estirpes do vírus influenza circulantes na população, a deteção de surtos e de vírus da gripe emergentes com potencial pandémico que constituam um risco para a saúde pública. Na componente clínica do PNVG, colabora a Rede de Médicos-Sentinela, com um papel especialmente relevante, possibilitando o cálculo da taxa de incidência da síndrome gripal e o acompanhamento da evolução da epidemia. Na componente laboratorial, colaboram igualmente a Rede de Médicos-Sentinela, a Rede de Serviços de Urgência/Ginecologia e Obstetria e os médicos do projeto Eu-

roEVA, através do envio de amostras respiratórias para a pesquisa do vírus influenza, constituindo desta forma um indicador do início da circulação do vírus da gripe em cada época.

A Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe (RPLDG) realiza a pesquisa laboratorial e contribui decisivamente para a caracterização do vírus influenza, em particular nas situações de infeção respiratória detetadas a nível hospitalar.

Os dados nacionais integram semanalmente os boletins das Redes Europeias de Vigilância da Gripe, coordenadas pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) e a Organização Mundial da Saúde (OMS).

Pretende-se com a presente publicação, sintetizar e divulgar os dados da análise preliminar da atividade gripal em Portugal, na época de 2013/2014 (até à semana 10/2014, i.e. início de março).

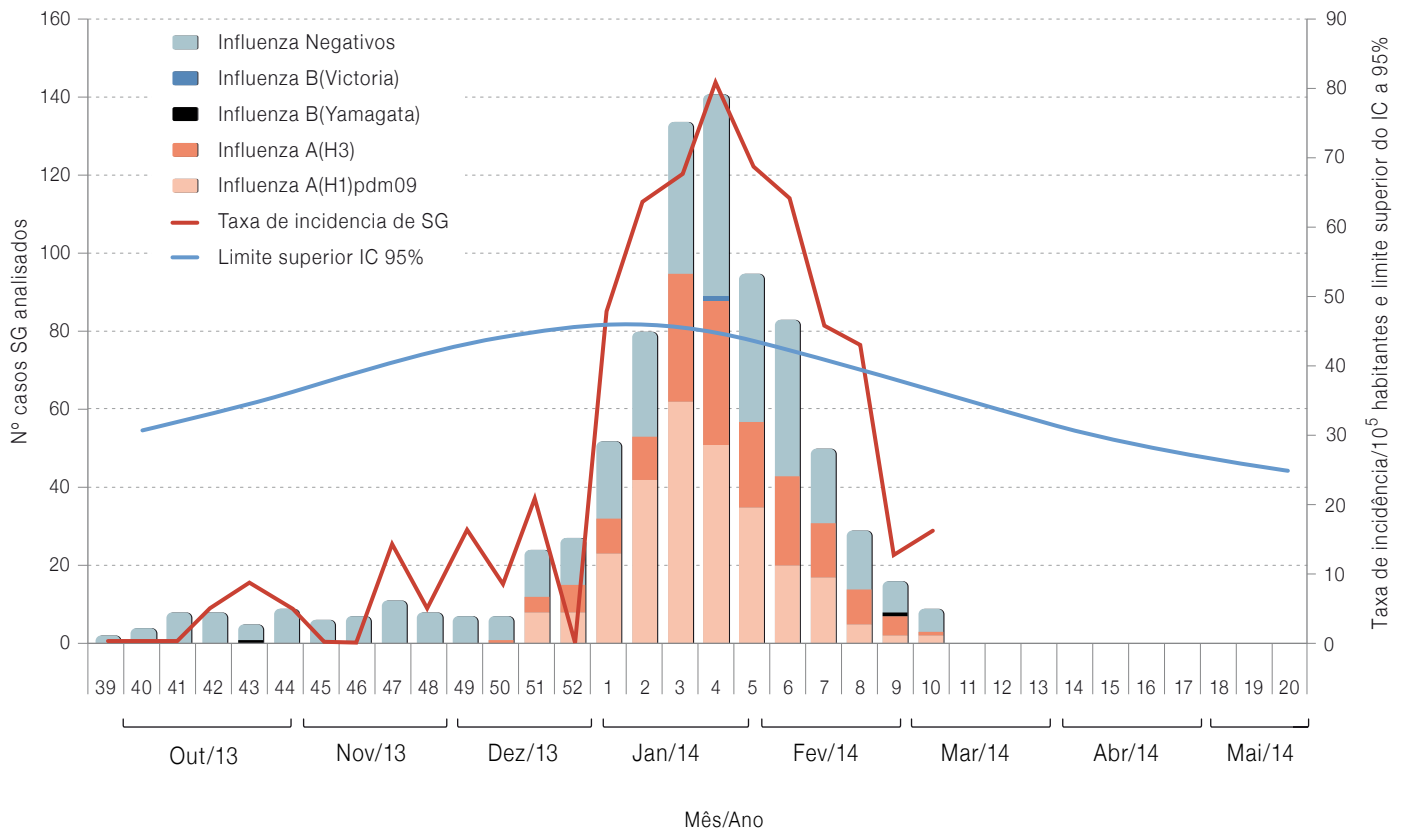
Vigilância clínica e laboratorial da gripe

Na época 2013/2014 a atividade gripal foi considerada moderada e o maior número de notificações foi observado no mês de janeiro e início de fevereiro. O período epidémico ocorreu entre as semanas 1/2014 e 8/2014, com um valor máximo de 80,7 casos de SG por 100 000 habitantes na semana 4/2014 (*Gráfico 1*). Relativamente às duas épocas anteriores, o período epidémico da presente época 2013/2014 ocorreu mais cedo, com um início antecipado em cerca de 4 semanas ^(2,3).

A análise laboratorial realizada até à semana 10/2014 (9 de março de 2014) a 824 exsudados da nasofaringe permitiu a identificação do vírus influenza em 455 (55,2%) casos de síndrome gripal (*Gráfico 2*). O vírus influenza A(H1)pdm09 e A(H3) co-circularam durante a época 2013/2014, especialmente durante o período epidémico, ou seja entre as semanas 1/2014 e 8/2014 (*Gráfico 1*).

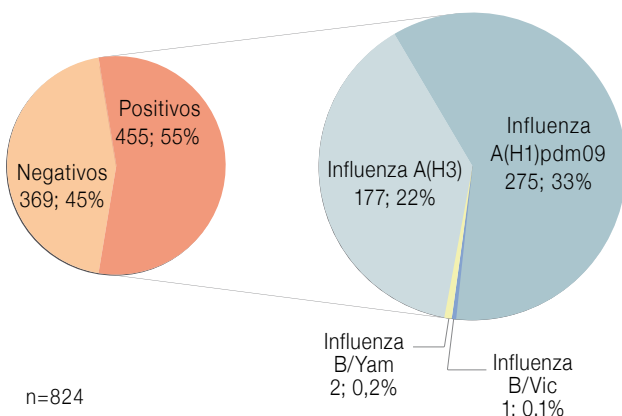
Foram identificados 275 (33%) casos de infeção por influenza A(H1)pdm09 e 177 (22%) casos por influenza A(H3) (*Gráfico 1 e 2*). Foram detetados 3 casos de infeção pelo vírus influenza do tipo B: 2 (0,2%) vírus da linhagem Yamagata e 1 (0,1%) vírus da linhagem Victoria (*Gráfico 1 e 2*).

Gráfico 1: Distribuição semanal dos casos de gripe detetados por RT-PCR em tempo-real, por tipo/subtipo do vírus influenza e segundo a semana de início da doença, na época 2013/2014 (até à semana 10/2014).



Inclui taxas de incidência semanais de SG por 100 000 habitantes, com indicação do limite superior do IC a 95% da área de atividade basal.

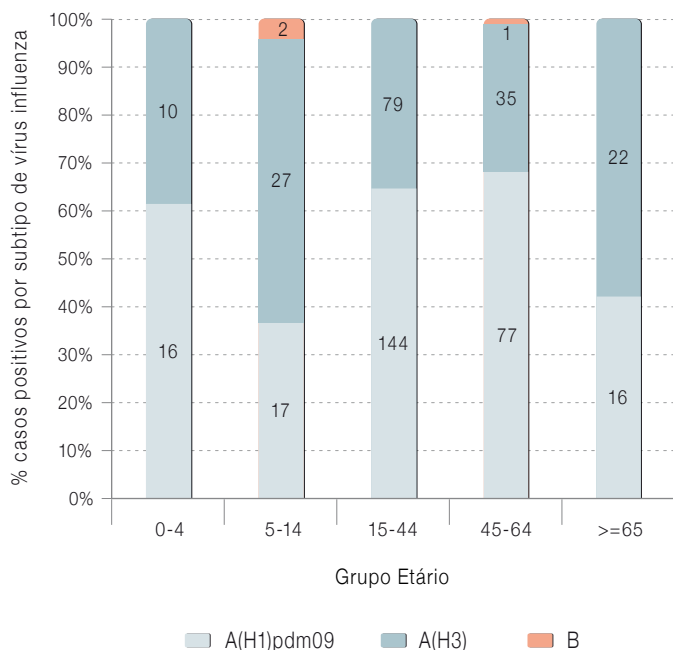
Gráfico 2: Distribuição percentual dos casos de SG notificados no âmbito do PNVG, com envio de exsudado da nasofaringe, segundo os resultados obtidos no diagnóstico laboratorial da gripe, na época de 2013/2014 (até semana 10/2014).



A distribuição dos casos de síndrome gripal por grupo etário, mostra que a maior percentagem de casos positivos para gripe foi em jovens/adultos com idades compreendidas entre os 15 e os 44 anos (59,3%; 223/376).

O vírus influenza A(H1)pdm09 foi detetado em maior percentagem do que o subtipo A(H3), nos grupos etários das crianças até 4 anos e dos adultos entre 15 e 64 anos (61,5% dos 0-4 anos, 64,6% dos 15-44 anos e 68,1% dos 45-64 anos) (Gráfico 3). O vírus influenza A(H3) foi predominantemente detetado nas crianças dos 5 aos 14 anos, e nos idosos (com idade superior a 65 anos), 58,7% e 57,9%, respetivamente.

Gráfico 3: Distribuição percentual dos casos de gripe por grupo etário, na época de 2013/2014 (até semana 10/2014).



Foram excluídos da análise 9 casos, por falta de informação sobre a idade.

_Caraterização do vírus da gripe

O Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e outros Vírus Respiratórios (LNRVG) do INSA realizou a análise complementar (caraterização antigénica, genética e pesquisa da susceptibilidade aos antivirais) aos vírus detetados nas amostras recebidas através do PNVG e também em amostras provenientes da RPLDG, durante a época de 2013/2014.

Análise antigénica: Até à semana 10/2014, foram analisados antigenicamente 145 vírus influenza: 120 vírus do subtipo A(H1)pdm09 semelhantes a A/California/7/2009, 21 vírus do subtipo A(H3) semelhantes a A/Texas/50/2012, 3 vírus B/Yamagata semelhantes a B/Massachusetts/2/2012 e um vírus B/Victoria semelhante a B/Brisbane/60/2008 (Gráfico 4). À exceção deste último, todos os restantes vírus analisados eram semelhantes às estirpes virais contempladas na vacina antigripal de 2013/2014 (4).

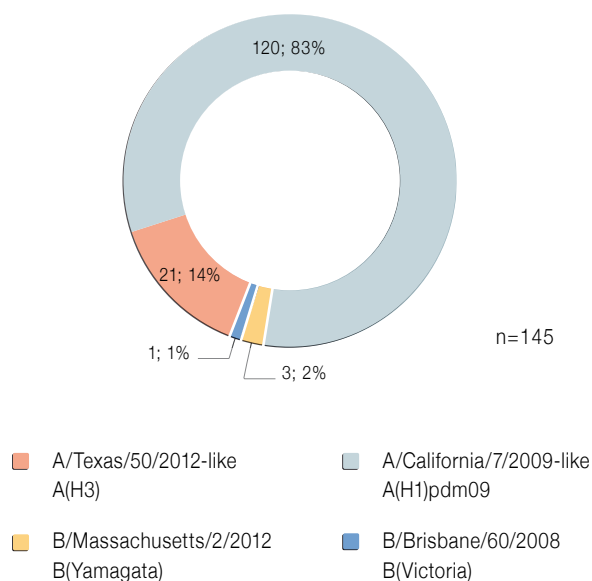
Análise genética: O LNRVG procedeu à análise genética (baseada na subunidade HA1 da hemaglutinina) de 45 vírus influenza: 25 A(H1)pdm09, 16 A(H3), 3 B/Yamagata e 1 B/Victoria.

Os vírus influenza A(H1)pdm09 caracterizados integram o grupo genético 6, representado pela estirpe A/St. Petersburg/27/2011, mais concretamente, no subgrupo 6B (representado por A/Norway/2417/2013), apresentando as substituições de aminoácidos K163Q, A256T e K283E na hemaglutinina viral.

Os vírus influenza A(H3) analisados pertencem ao grupo genético 3C (semelhantes a A/Texas/50/2012), mas distribuem-se por 2 subgrupos genéticos. Doze vírus pertencem ao subgrupo 3C.3 (representado pela estirpe de referência A/Samara/73/2013) e apresentam as substituições Q33R, T128A, R142G, N145S e N278K na hemaglutinina. Os restantes 4 vírus integram o subgrupo 3C.2 representado por A/Ireland/M28426/2013 (com as substituições Q33R, N145S e N278K).

Os vírus B/Yamagata caracterizados pertencem ao grupo genético 2 (representado por B/Massachusetts/2/2012) e apresentam as substituições R48K, P108A e T181A. A estirpe da linhagem B/Victoria pertence, por sua vez, ao grupo genético 1A representado por B/Brisbane/60/2008 com as substituições N75K, N165K, e S172P.

Gráfico 4: Caraterização antigénica das estirpes de vírus influenza A e B, isoladas na época 2013/2014.





Suscetibilidade aos antivirais: A vigilância da suscetibilidade do vírus da gripe aos antivirais é hoje uma das componentes da maior importância na Rede Europeia de Vigilância da Gripe, coordenada pelo ECDC e OMS, sendo a informação essencial à tomada de decisões relativas à prescrição dos antivirais, ao controlo de surtos e planos de contingência pandémicos (5). A responsabilidade da vigilância da suscetibilidade aos antivirais foi atribuída a laboratórios especializados, envolvidos na vigilância da gripe, como são os Laboratórios Nacionais de Referência para o Vírus da Gripe (6,7). Estes laboratórios têm capacidade para produzir atempadamente informação sobre a suscetibilidade aos antivirais, prestar apoio à decisão clínica, detetar precocemente estirpes resistentes e avaliar a sua capacidade de transmissão na comunidade e em meio hospitalar (7).

Presentemente a monitorização da suscetibilidade aos antivirais é realizada através da combinação de dois procedimentos laboratoriais: ensaios fenotípicos de inibição enzimática da neuraminidase (NA), utilizando o substrato fluorescente MUNANA (8), que permite determinar a concentração do antiviral necessária para reduzir a atividade enzimática em 50% (IC_{50}) e ensaios genotípicos [sequenciação genómica da NA e RT-PCR para H275Y no A(H1)pdm09] para a identificação de substituições de aminoácidos que conferem resistência (5, 6, 9). Foram considerados *major outliers* os isolados que apresentaram um valor de IC_{50} superior à mediana+3SD, e *minor outliers* os valores de IC_{50} superiores à mediana+1.65SD. Para as estirpes virais que apresentaram valo-

res de IC_{50} considerados *outliers* foi realizada a análise genética, do gene da NA, para a pesquisa de marcadores associados a uma redução de sensibilidade aos antivirais.

Na presente época foram analisadas pelo teste fenotípico 89 estirpes do vírus influenza [73 A(H1)pdm09, 12 A(H3) e 4 B] para avaliação da suscetibilidade aos inibidores da NA, oseltamivir e zanamivir. Os vírus influenza do tipo A mostram uma sensibilidade semelhante para ambos os inibidores da NA. Os vírus influenza do tipo B exibem uma menor sensibilidade para ambos os antivirais, com maior evidência para o oseltamivir, quando comparados com os vírus influenza do tipo A (Tabela 1).

Todos os vírus influenza A(H1)pdm09 (n=73) revelaram uma inibição normal ao oseltamivir e zanamivir, tendo sido identificados 5 *minor outliers* para o oseltamivir e 14 *outliers* para o zanamivir (13 *minor outliers* e 1 *major outlier*). Em 270 vírus influenza A(H1)pdm09 foi igualmente pesquisada a substituição H275Y no gene da NA, associada à resistência ao oseltamivir, não tendo sido detetada em nenhum dos vírus estudados.

Os 9 vírus influenza A(H3) testados para o oseltamivir e zanamivir apresentaram uma inibição normal, com a deteção de 2 *minor outliers* para o oseltamivir e 1 *minor outlier* para o zanamivir.

Os 4 vírus influenza B, detetados na presente época, apresentaram inibição normal para os inibidores da NA, apesar de um vírus influenza B da linhagem Victoria ser considerado *minor outlier* para o oseltamivir e um vírus influenza B da linhagem Victoria ser considerado *minor outlier* para o zanamivir.

Tabela 1: Valores de linha de base IC_{50} para os vírus influenza A e B, na época de 2013/2014.

Época 2013/2014		Inibidores da Neuraminidase			
		Oseltamivir		Zanamivir	
Vírus influenza (sub)tipo	Nº de isolados (n)	Valor de IC_{50} min.-máx.	Mediana ± Desvio-padrão robusto ^{a)} (nM)	Valor de IC_{50} min.-máx.	Mediana ± Desvio-padrão robusto ^{a)} (nM)
A(H3)	12	0,34 - 0,90	0,57 ± 1,17	0,52 - 1,62	0,75 ± 1,39
A(H1)pdm09	73 ^{b)}	0,27 - 2,09	0,68 ± 1,68	0,21 - 1,66	0,59 ± 1,40
B	4 ^{b)}	11,71 - 48,99	17,61 ± 1,48	2,59 - 3,22	2,80 ± 1,07

^{a)} Os valores de linha de base IC_{50} foram determinados pela análise estatística efetuada pelo programa *Robust Excel*

^{b)} Sete estirpes A(H1)pdm09 e uma estirpe influenza B são provenientes da RPLDG.



artigos breves_ n. 7

Os ensaios genómicos, para monitorização da suscetibilidade aos inibidores da NA dos vírus influenza A e B que incluem, para além de outros, os isolados considerados *outliers* nos testes fenotípicos, não evidenciaram qualquer substituição de aminoácidos associada à redução de suscetibilidade aos inibidores da NA.

Conclusão

Na época de vigilância 2013/2014, a atividade gripal foi moderada ao longo de todo o inverno com taxas de incidência de casos de síndrome gripal semelhantes às verificadas na passada época de 2012/2013. O período epidémico foi mais precoce e de menor duração, relativamente ao inverno anterior. O vírus influenza do tipo A foi o predominantemente detetado neste inverno, com a co-circulação dos dois subtipos: vírus influenza A(H1)pdm09 e A(H3). Foram detetados três casos esporádicos do vírus influenza B. A análise genética das estirpes do vírus influenza A(H1)pdm09 e A(H3) revelou alguma evolução relativamente às estirpes vacinais da época 2013/2014, mantendo-se antígenicamente semelhantes a estas estirpes. Os vírus influenza B da linhagem Yamagata são genética e antígenicamente semelhantes à estirpe vacinal B/Massachusetts/2/2012.

A vigilância da suscetibilidade aos antivirais inibidores da neuraminidase para os vírus influenza A e B revelou que todas as estirpes apresentam uma inibição normal, sendo consideradas sensíveis ao oseltamivir e zanamivir.

Agradecimentos

Os Autores agradecem: à Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe, aos Médicos-Sentinela, aos Serviços de Urgência/Ginecologia e Obstetria e aos participantes no estudo EuroEVA; à Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA; ao Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Doenças Infeciosas do INSA; à equipa do Laboratório da Gripe do "National Institute for Medical Research, Medical Research Council, Mill Hill, London"- Centro Mundial de Referência para a Europa da Organização Mundial da Saúde, coordenado pelo Doutor John McCauley; à Doutora Cristina Furtado pela revisão científica do artigo.

Referências bibliográficas:

- (1) Nunes B, Viboud C, Machado A, *et al.* Excess mortality associated with influenza epidemics in Portugal, 1980 to 2004. *PLoS One*. 2011;6(6): e20661. doi:10.1371/journal.pone.0020661 [LINK](#)
- (2) Gonçalves P, Pechirra P, Conde P, *et al.* Programa Nacional de Vigilância da Gripe, Relatório da Época 2011/2012. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. [LINK](#)
- (3) Guiomar R, Conde P, Cristóvão P, *et al.* Programa Nacional de Vigilância da Gripe, Relatório da Época 2012/2013. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, 2013. [LINK](#)
- (4) Direção-Geral da Saúde. Orientação 012/2013 de 25/09/2013: Vacinação contra a gripe com a vacina trivalente para a época 2013/2014. [LINK](#)
- (5) Okomo-Adhiambo M, Nguyen HT, Abd Elal A, *et al.* Drug susceptibility surveillance of influenza viruses circulating in the United States in 2011-2012: application of the WHO antiviral working group criteria. *Influenza and Other Respir Viruses*. 2014;8(2):258-65.
- (6) Pozo F, Lina B, Andrade HR, *et al.* Guidance for clinical and public health laboratories testing for influenza virus antiviral drug susceptibility in Europe. *J Clin Virol*. 2013;57(1):5-12.
- (7) World Health Organisation. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec*. 2012;87(39):369-80. [LINK](#)
- (8) WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: World Health Organization, 2011. [LINK](#)
- (9) Okomo-Adhiambo M, Sleeman K, Lysén C, *et al.* Neuraminidase inhibitor susceptibility surveillance of influenza viruses circulating worldwide during the 2011 Southern Hemisphere season. *Influenza and Other Respir Viruses*. 2013;7(5):645-58.