



## Suscetibilidade dos vírus da gripe aos antivirais inibidores da neuraminidase em Portugal, 2009-2014

Patrícia Conde<sup>1</sup>, Pedro Pechirra<sup>1</sup>, Paula Cristóvão<sup>1</sup>,  
Ana Carina Maia<sup>1</sup>, Cristina Furtado<sup>2</sup>, Raquel Guiomar<sup>1</sup>

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) Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica. Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

### Introdução

O impacto das epidemias anuais de gripe na morbidade e mortalidade tem sido alvo da maior atenção desde longa data (1). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a gripe é responsável por um quarto a meio milhão de óbitos por ano em todo o mundo.

A vacinação continua a ser a principal medida de prevenção contra a gripe, mesmo, e apesar, do longo período para a produção da vacina e respetiva distribuição pela população. Os antivirais têm também uma longa e extensa história no tratamento e prevenção da gripe, sendo hoje uma importante opção para o tratamento da doença, bem como a medida de prevenção de eleição numa fase inicial de uma pandemia (2). O reduzido número de medicamentos autorizados para o tratamento da gripe levanta algumas preocupações, particularmente no que diz respeito às resistências aos antivirais (2), sendo, por isso, fundamental o estudo dos mecanismos de resistência aos antivirais inibidores da neuraminidase. As mutações constantes do vírus da gripe requerem, também, uma monitorização contínua especialmente das já descritas como associadas a alterações da suscetibilidade aos antivirais, quer a nível do ambulatório, quer a nível hospitalar. A baixa prevalência de resistência ao oseltamivir e zanamivir, observada nos vírus da gripe circulantes na população humana, não exclui a possibilidade de uma rápida emergência de resistência e, conseqüente, transmissão e propagação destes agentes resistentes na comunidade (3).

Este trabalho é o mais recente estudo retrospectivo sobre a resistência do vírus da gripe aos antivirais, conduzido no âmbito do Progra-

ma Nacional de Vigilância da Gripe, depois da pandemia de 2009, e reúne a informação de um elevado número de estirpes do vírus da gripe, detetados em doentes da comunidade e hospitalizados, de todo o território nacional e durante as últimas cinco épocas gripais.

### Objetivos

Neste trabalho pretendeu-se descrever o perfil de suscetibilidade dos vírus da gripe do tipo A e B aos antivirais inibidores da neuraminidase (NAI), oseltamivir e zanamivir, em doentes com quadro clínico de síndrome gripal (SG) (4), diagnosticados e notificados no âmbito do Programa Nacional de Vigilância da Gripe entre 2009 e 2014.

### Material e métodos

As notificações clínicas dos casos SG e as amostras biológicas foram enviadas ao Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), entre 2009 e 2014, pela Rede de Médicos-Sentinela, Rede de Serviços de Urgência/Obstetria, médicos participantes no projeto EuroEva/I-MOVE e Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe, que integram o Programa Nacional de Vigilância da Gripe.

A deteção do vírus da gripe foi realizada por RT-PCR em tempo real e cultura viral em linha celular MDCK (5). A avaliação da suscetibilidade aos NAI foi realizada no Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, aplicando métodos de referência que incluem os testes fenotípicos para a determinação do IC<sub>50</sub>, através do ensaio de inibição da neuraminidase, utilizando um substrato fluorescente, ácido 2'-(4-methylumbelliferyl)-a-D-N-acetylneuraminic, (MUNANA), e testes genotípicos, que incluíram a sequenciação genómica da região codificante do gene da neuraminidase (NA) e a pesquisa da substituição H275Y no gene da NA, no vírus influenza A(H1N1)pdm09, por RT-PCR em tempo real (6).

### Resultados

Durante o período do estudo foram avaliadas 357 estirpes dos vírus da gripe (206 influenza A e 151 influenza B) pelo ensaio fenotípico para a determinação da suscetibilidade ao oseltamivir e zanamivir. Foram pesquisadas, em 170 estirpes virais, as substituições associadas à resistência aos NAI (7). Em 643 amostras positivas para o

artigos breves\_ n. 2

vírus influenza A(H1)pdm09 foi pesquisada a substituição H275Y, por RT-PCR em tempo real. Os vírus estudados refletem a prevalência do tipo/subtipo em cada inverno. O vírus da gripe A(H1)pdm09 predominou nas épocas de 2009/10, 2010/11 e 2013/14, o vírus A(H3) predominou em 2011/12 e o vírus do tipo B circulou em simultâneo com o vírus A(H1)pdm09 em 2010/11 e 2012/13, tendo sido predominante nesta última época.

Os dados da análise fenotípica mostraram diferenças nos valores de  $IC_{50}$  medianos de acordo com o tipo/subtipo e o antiviral analisado (Gráficos 1, 2 e 3). Os vírus da gripe do tipo A demonstraram uma maior suscetibilidade aos inibidores da neuraminidase, quando comparados com os vírus do tipo B. Esta diferença foi mais notória relativamente ao oseltamivir.

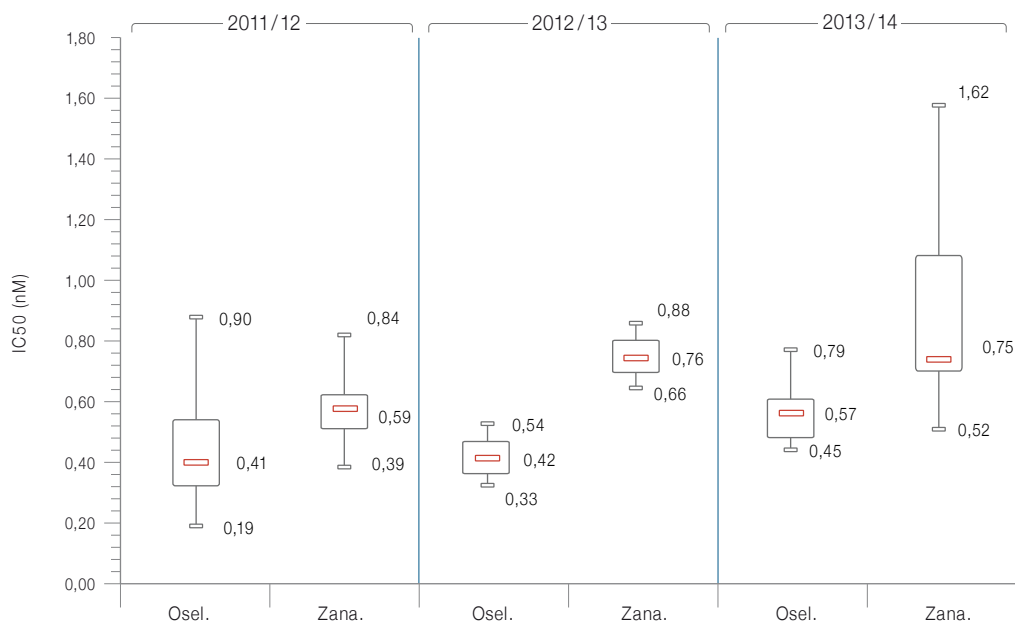
Os vírus A(H3) mostraram uma maior suscetibilidade ao oseltamivir (valores de  $IC_{50}$  entre 0,41 e 0,57nM), quando comparado com o zanamivir (valores de  $IC_{50}$  entre 0,59 e 0,76nM) (Gráfico 1).

Nos vírus A(H1)pdm09, os valores de  $IC_{50}$  medianos para os dois antivirais em estudo foram muito semelhantes, embora evidenciem

uma suscetibilidade ligeiramente maior ao zanamivir (Gráfico 2). Os vírus do tipo B, foram consideravelmente mais suscetíveis ao zanamivir (valores de  $IC_{50}$  entre 2,80 e 6,69 nM) que ao oseltamivir (valores de  $IC_{50}$  entre 15,14 e 30,73 nM). Esta diferença de suscetibilidade para os dois antivirais foi ainda mas evidente quando os valores medianos de  $IC_{50}$  foram analisados por linhagem Victoria/Yamagata. Os vírus da linhagem Victoria apresentaram suscetibilidade ao oseltamivir duas vezes menor, relativamente à linhagem Yamagata, bem evidenciada pelos valores de  $IC_{50}$  na época 2010/2011, quando foi predominante a circulação dos vírus da linhagem Victoria (Gráfico 3). Estes resultados sugerem que a linhagem Yamagata apresentou uma maior suscetibilidade ao oseltamivir.

Para o estudo da suscetibilidade aos antivirais ao longo do tempo, foi realizada a análise de acordo com o ano de isolamento da estirpe viral (Gráficos 1, 2 e 3). Os resultados mostram uma variação de época para época para cada um dos (sub)tipos, não sendo no entanto visível uma clara tendência para o aumento dos valores de  $IC_{50}$  ao longo do período do estudo. Os testes fenotípicos permitiram, em 2009/2010, a deteção de um vírus A(H1)pdm09 resistente ao oseltamivir, com uma redução de 720 vezes na suscetibilidade

Gráfico 1: Análise dos valores de  $IC_{50}$  (nM) para os vírus da gripe A(H3), por época (2011-2014), obtidos pelo ensaio de inibição da neuraminidase (fluorescência).



A caixa representa os valores entre o primeiro e terceiro quartil.

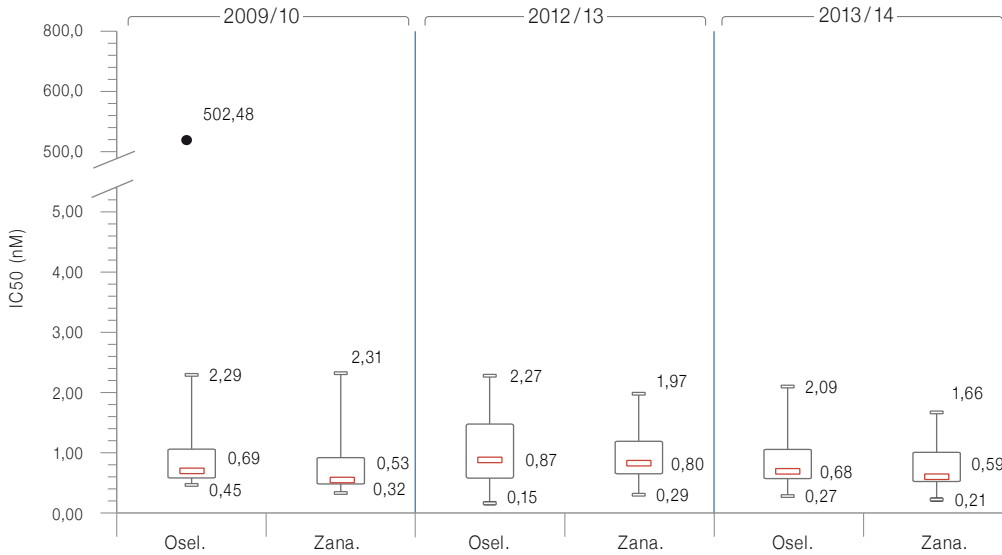
O valor mediano está indicado pela linha no interior da caixa.

Vírus analisados por época:  
n=33 (2011/2012); n=2 (2012/2013);  
n=12 (2013/2014).

Osel.= oseltamivir; Zana.= zanamivir.

artigos breves\_ n. 2

Gráfico 2: Análise dos valores de  $IC_{50}$  (nM) para os vírus da gripe A(H1)pdm09, por época (2009-2014), obtidos pelo ensaio de inibição da neuraminidase (fluorescência).



A caixa representa os valores entre o primeiro e terceiro quartil.

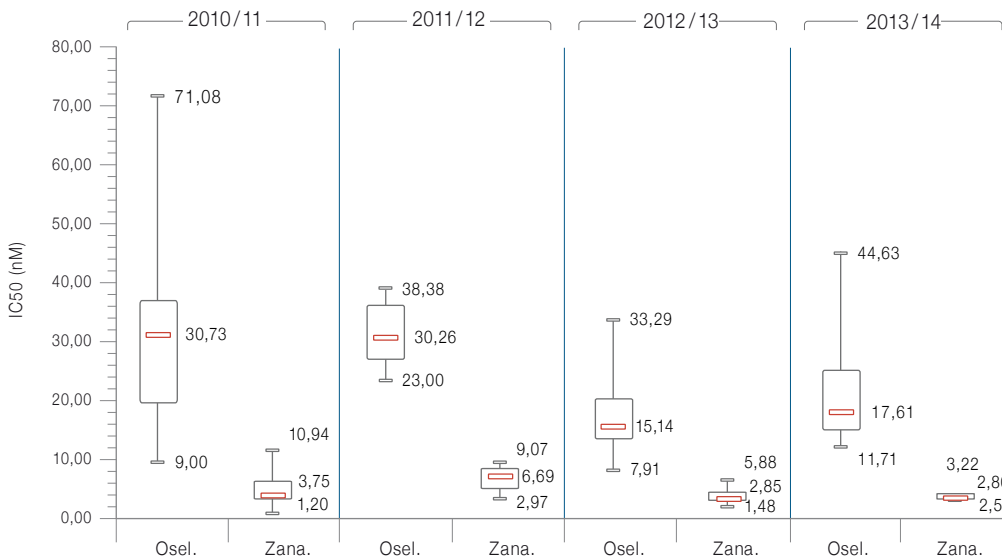
O valor mediano está indicado pela linha no interior da caixa.

Vírus analisados por época:  
n=25 (2009/2010); n=60 (2012/2013);  
n=73 (2013/2014).

Osel.= oseltamivir; Zana.= zanamivir.

● =A/Lisboa/171/2009 (H1pdm09) resistente ao oseltamivir.

Gráfico 3: Análise dos valores de  $IC_{50}$  (nM) para os vírus da gripe B, por época (2010-2014), obtidos pelo ensaio de inibição da neuraminidase (fluorescência).



A caixa representa os valores entre o primeiro e terceiro quartil.

O valor mediano está indicado pela linha no interior da caixa.

Vírus analisados por época:  
n=51(osel.)/48(zana.)(2010/2011);  
n=6 (2011/2012); n=90 (2012/2013);  
n=4 (2013/2014).

Osel.= oseltamivir; Zana.= zanamivir.

artigos breves\_ n. 2

ao oseltamivir ( $IC_{50}=502,48$ ). A este caso estava associada uma história de tratamento anterior com oseltamivir e de doença crónica imunossupressora. Durante a época de 2010/2011 foram identificados mais 2 vírus A(H1)pdm09 resistentes ao oseltamivir, através dos ensaios genotípicos. A um destes casos estava igualmente associado um tratamento prévio com o antiviral, doença crónica imunossupressora e gravidez. Em relação ao outro caso não foi possível obter informação clínica e/ou epidemiológica sobre o mesmo.

A análise da região codificante do gene da NA, realizada em 170 estirpes dos vírus da gripe, incluiu estirpes com valores de  $IC_{50}$  outliers e wild type. Através desta análise foram identificados 2 vírus A(H1)pdm09 com a substituição H275Y, associada à resistência ao oseltamivir. Nenhum dos outros vírus analisados, incluindo os outliers, sofreu alguma substituição de aminoácidos relacionada com a redução da suscetibilidade aos antivirais (7). Entre 2009 e 2014 foi pesquisada a mutação H275Y por PCR em 643 vírus A(H1)pdm09. Esta mutação foi detetada em 3 estirpes virais, o que corresponde a 0,5% (3/643) do total dos casos analisados.

### \_Discussão e conclusão

Face aos resultados obtidos, não se verificaram alterações graduais no perfil de suscetibilidade aos NAI ao longo do período em estudo (2009-2014). Foram detetados 3 vírus do subtipo A(H1)pdm09 resistentes ao oseltamivir, dois dos quais em doentes sob terapêutica antiviral e em situação de imunossupressão. No entanto, não se observou a transmissão de estirpes resistentes aos NAI na comunidade. Os resultados dos ensaios laboratoriais evidenciaram que os vírus da gripe do tipo A [A(H1)pdm09 e A(H3)] apresentam uma maior sensibilidade aos NAI quando comparados com os vírus da gripe do tipo B.

Em conclusão, os resultados da vigilância da suscetibilidade dos vírus da gripe aos NAI mostram que, na sua grande maioria, os vírus em circulação em Portugal são suscetíveis ao oseltamivir e zanamivir. No entanto, e devido à elevada variabilidade dos vírus da gripe, é de grande importância dar continuidade ao estudo da suscetibilidade aos NAI nos atuais e futuros vírus circulantes. Constituinte um dos principais objetivos da vigilância da suscetibilidade aos antivirais para os vírus da gripe, é fundamental con-

tinuar a garantir a utilização e integração da informação dos ensaios fenotípicos e genotípicos, por forma a aumentar a rapidez na deteção de vírus resistentes, a identificar novas mutações associadas à redução da suscetibilidade aos NAI, e permitir a deteção da emergência e transmissão de variantes resistentes aos antivirais.

### \_Agradecimentos

À Rede de Médicos-Sentinelas, Rede de Serviços de Urgência/Obstetria, médicos participantes no projeto EuroEva/I-MOVE e Rede Portuguesa de Laboratórios para o Diagnóstico da Gripe que contribuem para a vigilância da gripe, em Portugal; À Unidade de Tecnologia e Inovação do Departamento de Genética Humana do INSA, pelo serviço de sequenciação genómica prestado; À Carla Roque da Unidade de Culturas Celulares do Departamento de Doenças Infecciosas do INSA; Ao Dr. John McCauley e colaboradores do WHO Collaborating Centre (NIMR, London) por providenciarem os antígenos e os vírus de referência para a caracterização antigénica dos vírus da gripe, isolados em cultura celular no Laboratório Nacional de Referência para o Vírus da Gripe e Outros Vírus Respiratórios; À F. Hoffmann-La Roche Ltd, Basel, Switzerland pelo fornecimento do oseltamivir e à GlaxoSmithKline, United Kingdom pela disponibilização do zanamivir.

### Referências bibliográficas:

- (1) Monto AS, McKimm-Breschkin JL, Macken C, et al. Detection of Influenza Viruses Resistant to Neuraminidase Inhibitors in Global Surveillance during the First 3 Years of Their Use. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(7):2395-402. [LINK](#)
- (2) Wathen MW, Barro M, Bright RA. Antivirals in seasonal and pandemic influenza-future perspectives. *Influenza Other Respir Viruses.* 2012;7(Suppl1):76-80.
- (3) Barr IG, McCauley J, Cox N, et al; Writing Committee of the World Health Organization Consultation on Northern Hemisphere Influenza Vaccine Composition for 2009-2010. Epidemiological, antigenic and genetic characteristics of seasonal influenza A(H1N1), A(H3N2) and B influenza viruses: basis for the WHO recommendation on the composition of influenza vaccines for use in the 2009-2010 Northern Hemisphere season. *Vaccine.* 2010;28(5):1156-67.
- (4) European Centre for Disease Prevention and Control. Influenza case definitions [Em linha]. [consult. 11/4/2014]. [LINK](#)
- (5) Public Health England. European collection of cell culture [Em linha]. [consult. 11/4/2014]. [LINK](#)
- (6) WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Geneva: WHO, 2011. [LINK](#)
- (7) International Society for Influenza and other Respiratory Virus Diseases. Amino acid substitutions in the NAs of variants in clinical samples or isolates causing reduced antiviral susceptibility [Em linha]. [consult. 11/4/2014]. [LINK](#)