

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –
MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia
LINHA DE PESQUISA: - Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos
Fisiopatológicos

DANIELE ANTONELLO CAMPOS

Infecção respiratória causada pelo Vírus Influenza em pacientes
atendidos na rede primária de atenção à saúde no município de
Guarapuava-PR

GUARAPUAVA – 2015

DANIELE ANTONELLO CAMPOS

**Infecção respiratória causada pelo Vírus Influenza em pacientes
atendidos na rede primária de atenção à saúde no município de
Guarapuava-PR**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas, área de Concentração fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à farmácia, da UNICENTRO.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Carraro

GUARAPUAVA - 2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai Maurício,
À minha mãe Margareth e às minhas irmãs
Larissa e Letícia, por serem minha
base e meu ponto de equilíbrio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre me proporcionar caminhos e me orientar em minhas escolhas, dono de todo conhecimento e sabedoria, sendo meu sustento de força e luta e fé.

À minha família pelo apoio e amor, mesmo distantes fisicamente sempre se tornaram presentes no meu dia-a-dia, minha base, amo incondicionalmente pai Maurício, mãe Margareth, irmãs Larissa e minha gêmea Letícia, pelos inúmeros conselhos e ajuda.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Emerson Carraro, pela orientação competente, por todos os ensinamentos, pela dedicação na minha formação e auxílio na elaboração da minha dissertação.

Aos meus amigos de graduação que vivenciaram comigo nestes anos de estudos, principalmente aos que continuaram comigo nesta jornada da pós-graduação.

Ao meu namorado, Thiago, pelo incentivo e apoio para a finalização dessa dissertação, idas ao laboratório para terminar os experimentos.

Ao MUR, que foram minha segunda família, os amigos meus que nasceram e/ou fortaleceram pela fé do Ministério Universidades Renovadas, que juntos vivemos esse sonho de Deus de amor para o mundo.

À Universidade Estadual do Centro-Oeste, na pessoa do seu Reitor, Aldo Nelson Bona.

À Profa. Dra. Rubiana Mainardes, Coordenadora da Pós- Graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante o curso e para a realização deste trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos durante as disciplinas cursadas.

Aos colegas de mestrado.

Fundamentais no início da aprendizagem dos experimentos Leni Macedo Semaan e Veronica Ambrosini.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigada à todos.

“Confia no Senhor de todo o teu coração
e não te estribes no teu próprio entendimento.
Reconhece-o em todos os teus caminhos,
e Ele endireitará as tuas veredas.” –
(Provérbios 3, 5-6)

RESUMO

As infecções respiratórias agudas são as doenças mais comuns em todos os indivíduos. Os vírus influenza A e B têm sido relatados como a etiologia de mais de 50% das infecções respiratórias agudas em todo o mundo. Este estudo teve como objetivo descrever o perfil epidemiológico e demográfico dos casos de pacientes com doenças respiratórias aguda causadas pelo vírus influenza A e B na comunidade de Guarapuava. Foram coletadas 144 amostras de secreção nasal de pacientes com sintomas de infecção respiratória atendidas no Posto de assistência primária à saúde da Vila Carli, em Guarapuava-PR, durante o período de dois invernos consecutivos. Para investigação da ocorrência do influenza A e B foi padronizada e aplicada a metodologia de reação em cadeia da polimerase precedida de transcrição reversa (RT-PCR). As infecções respiratórias foram caracterizadas pela presença de: coriza (95,81%) e tosse (74,31%), sendo que os pacientes foram atendidos com mediana de 4 dias desde o início dos sintomas. Entre as principais comorbidades que os pacientes sintomáticos relataram constam a hipertensão (%) e diabetes (%), sendo que 32% dos pacientes estavam imunizados contra influenza. E a metodologia RT-PCR padronizada foi aplicada nas amostras, no entanto, foram detectados casos de infecção respiratória por influenza B apenas em três pacientes com sintomas respiratórios na cidade de Guarapuava- PR, o que prejudicou a descrição dos quadros clínicos, associação de fatores de risco e utilização de medicamentos nos casos infectados. Com isto sugerem que deve ser dada mais atenção aos patógenos virais, aumentando os cuidados de saúde durante a temporada de gripe, principalmente nesta região do Paraná, visto que é uma região fria, para obter um diagnóstico mais preciso dessa população.

Palavras chaves: infecção respiratória, influenza, diagnóstico

ABSTRACT

Acute respiratory infections are the most common disease in all individuals. Influenza viruses A and B have been reported as the etiology of more than 50% of acute respiratory infections worldwide. This study aimed to describe the epidemiological and demographic profile cases of patients with acute respiratory illness caused by influenza A and B in Guarapuava community. We collected 144 samples of nasal secretions from patients with symptoms of respiratory infection treated at primary care Desk's health Vila Carli, in Guarapuava-PR, for a period of two consecutive winters. For investigation of the occurrence of influenza A and B was standardized and applied to polymerase chain reaction methodology preceded by reverse transcription (RT-PCR). Respiratory infections were characterized by the presence of: rhinorrhea (95.81%) and cough (74.31%), and patients were treated with a median of 4 days from the onset of symptoms. Among the comorbidities main symptomatic patients reported listed Hypertension (%) and diabetes (%), and 32% of patients were immunized against influenza. And the standard RT-PCR methodology was applied to the samples, however, they were reported cases of respiratory infection, influenza B only in three patients with respiratory symptoms in the city of Guarapuava- PR, which detracted from the description of clinical conditions associated factors risk and use of drugs in infected cases. With this suggests that more attention should be given to viral pathogens, increasing health care during flu season, especially in this region of Paraná, since it is a cold region, for a more accurate diagnosis of this population.

Keywords: respiratory infection, influenza diagnosis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do vírus da influenza, com a visualização das proteínas hemaglutinina (HÁ), neuraminidase (NA) e M2(canal Iônico), membrana, complexo da RNA polimerase (M1) e complexo de nucleoproteína (NP e RNP), além de todos os genes (números 1a 8) que compõem o vírus da influenza A e B.....p.21

Figura 2: Mutações antigênicas; pequenas mutações (antigenic drift) e a formação de novas cepas originando novas linhagens (antigenic shift) (Adaptado de RONALDO DIAS, 2011).....p.22

Figura 3: Monitoramento das doenças Respiratórias pelo número de casos de influenza por subtipo, por faixa etária no Paraná, SE 01 a SE 13/2013.....p.27

Figura 4: Distribuição dos pacientes incluídos no estudo por faixa etária.....p.42

Figura 5: Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo.. p.43

Figura 6: Ocorrência dos sintomas respiratórios e sintomas gerais.....p.44

Figura 7: Representação gráfica do número de pacientes que tiveram a imunização prévia para o vírus Influenza.....p.46

Figura 8: Amplificação de cepas controles de Influenza A (698pb) em gel de agarose 1,2%.p.49

Figura 9: Resultado da amplificação pela **RT-PCR** da cepa controle de Influenza utilizando PCR SuperMix®, visualizado em gel de agarose a 1,2%p.50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características do vírus influenza: subtipos A, B e Cp.19

Tabela 2: Reagentes utilizados na reação da Transcrição Reversa.
.....p.35

Tabela 3: Reagentes utilizados na reação da amplificação da PCR.....p.36

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos primers utilizados para amplificação do Influenza A e B.....p.37

Tabela 5: Reagentes para amplificação de Influenza utilizando um Mix de reagentes prontos PCR SuperMix® p.38

Tabela 6: Gênero e idade dos casos atendidos no Posto de Saúde Vila Carli de atenção primária à saúde na Comunidade de Guarapuava – Prp. 41

Tabela 7: Presença de comorbidades nos pacientes infectados por doenças respiratórias. p.45

Tabela 8: Pacientes vacinados e não vacinados inclusos no estudo, de acordo com a faixa etária.....p.46

Tabela 9: Terapias medicamentosas realizadas por pacientes sintomáticos as infecções respiratórias.....p.47

Tabela 10: Temperaturas e tempos de anelamento do primers testados na reação de amplificação do influenza A e influenza B.p.48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Pb	Pares de bases
cDNA	Ácido Dexorribonucléico Complementar
dATP	Desoxinucleotídeo de Adenina Trifosfato
dCTP	Desoxinucleotídeo de Citosina trifosfato
dGTP	Desoxinucleotídeo de Guanina Trifosfato
dTTP	Desoxinucleotídeo de Timina Trifosfato
DNA	Ácido Dexorribonucléico
dNTPs	Desoxinucleotídeos Trifosfato
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
OMS	Organização Mundial da Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA _m	Ácido Ribonucleico mensageiro
rpm	Rotação Por Minuto
RT-PCR	Transcrição Reversa-Reação da Cadeia da Polimerase
VP	Viral Protein
IRA	Infecção respiratória aguda
LACEN	Laboratório Central do Estado do Paraná
CIEVS	Centro de informação e respostas estratégias de Vigilância em
SRAG	Saúde
HAS	Síndrome respiratória aguda
EUA	Hipertensão arterial sistêmica
UNIFESP	Estados Unidos da América
HA	Universidade Federal de São Paulo
NA	Hemaglutinina
CDC	Neuraminidase
	Centers for Disease Control and Prevention

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
Min	Minuto
ml	Mililitro
µL	Microlitro
µM	Micromolar
Nmol	Nanomol
M	Metros
Km ²	Quilômetros quadrados
°C	grau Celsius
±	mais ou menos
v/v	volume/volume
q.s.p.	quantidade suficiente para

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Doenças Respiratórias	14
1.2 Histórico do Vírus Influenza	15
1.3 Caracterização do Vírus Influenza	16
1.4 Variações antigênicas	19
1.5 Transmissão.....	21
1.6 Manifestações clínicas	22
1.6 Epidemiologia e Vigilância Epidemiológica	22
1.7 Imunização.....	25
1.8 Diagnóstico	28
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3. METODOLOGIA.....	31
3.1 População do Estudo	31
3.2 Coleta das Amostras	31
3.3 Processamento do Material Clínico.....	32
3.4 Extração dos Ácidos Nucleicos	33
3.5 Cepas Controles	33
3.6 Transcrição Reversa – RT	33
3.7 Amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase	35
3.8 Reação em Cadeia da Polimerase utilizando o PCR SuperMix®	38
3.9 Eletroforese em Gel de Agarose	38
3.9.1 Padronização da RT-PCR	39
3.9.2 Limite de Detecção	39

3.9.3	Varição na temperatura de anelamento	40
3.9.4	Variações na Concentração do Cloreto	40
3.9.5	Curva da enzima.....	40
4	RESULTADOS	41
4.1	Inclusão de pacientes	41
4.2	Períodos de inclusão dos pacientes.....	42
4.3	Quadro Clínico: Sintomas	43
4.4	Comorbidades.....	44
4.5	Vacina	45
4.6	Tratamentos.....	46
4.7	Padronização do ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ..	47
4.8	Padronização do Ensaio de Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) utilizando reagente PCR SuperMix®.....	49
4.9	Aplicação da Metodologia RT-PCR nas amostras inclusas no estudo para detecção de Inluenza A e B	50
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÃO.....	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças Respiratórias

As infecções respiratórias agudas (IRA) são as principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, especialmente em crianças durante os primeiros anos de vida (OSTERHAUS, 2008). A faixa etária pediátrica é o principal grupo afetado por IRA, que ocorrem 3-8 vezes por ano em lactentes e crianças jovens, com incidências variando inversamente à idade (BRYCE et al., 2005; BEZERRA et al., 2011). No entanto, crianças pequenas, idosos e pacientes imunodeprimidos podem desenvolver complicações como a pneumonia, que pode ocasionalmente ser fatal (MONTANO, 2002; RICCETTO et al., 2009).

Estima-se que nos Estados Unidos da América (EUA) ocorram mais de 200 milhões de episódios, resultando em mais de 5 milhões de pneumonias em pessoas de todas as idades. As estimativas apontam para consequências sociais e econômicas ainda maiores, com aproximadamente 100 milhões de dias de trabalho perdidos por adultos infectados e mais de 90 milhões de dias em absenteísmo escolar de crianças devido a essa doença (NEUZIL et al., 2001).

Há mais de 200 vírus antigenicamente distintos o que leva de forma esporádica vários episódios de infecções do trato respiratório durante o ano, podendo uma mesma pessoa apresentar mais de um episódio de infecção ao decorrer do ano (MACKIE, 2003). Os vírus mais comumente associados com IRA são vírus influenza A e B (IVA e IVB), vírus sincicial respiratório (VSR), vírus parainfluenza (PIV 1-4), adenovírus humano (HAdV), rinovírus humano (HRV), coronavírus humano (HCoV) e enterovírus (EV) (ARRUDA et al., 2006). Desde 2001, novos vírus foram detectados em casos de IRA, tais como metapneumovírus humano (hMPV) (VAN DEN HOOGEN et al., 2001); dois novos tipos de HCoV, HKU1 e NL63 (VAN DER HOEK et al., 2004, WOO et al., 2005) e bocavirus humano (HBoV) (ALLANDER et al., 2005).

O vírus influenza ganhou destaque a partir da grande pandemia de 1918, sendo preocupação constante da Organização mundial de Saúde (OMS). E o impacto econômico das epidemias de Influenza é consideravelmente alto,

nos países industrializados o custo total estimado é de 10 – 60 milhões de dólares por milhão de pessoas (JANSEN et al., 2007). Estimativas de dados norte-americanos apontam que cerca de 31 milhões de atendimentos em serviços de saúde primária como o responsável direto o vírus influenza. Toda essa demanda de serviços e recursos da área de saúde resulta em custos diretos e indiretos estimados em mais de 80 bilhões de dólares americanos (LEE., 2007).

Nos países em desenvolvimento, as IRAs têm um grande impacto na população em geral. Elas são a primeira causa de morte nos países de baixa renda e a quarta em países de renda média, como o Brasil (RICETTO et al., 2009). No Brasil, em 2004, a mortalidade por causas de IRA foi de cinco para cada 1000 crianças, ficando em segundo lugar se excluídas as causas perinatais e malformações congênitas. No ano de 2005, ocorreram em torno de 575.000 internações por doença respiratória em crianças menores que cinco anos de idade, sendo 185.000 na região Sudeste. Somente no período de janeiro a setembro de 2006, os gastos do Ministério da Saúde foram de 135 milhões de reais com internações por bronquiolite e pneumonia em crianças menores de cinco anos de idade (PECCHINI, 2008).

No Brasil, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, as complicações decorrentes da infecção por Influenza nos pacientes idosos foram responsáveis por cerca de 140.000 internações hospitalares ao ano, durante o período de 1995 a 2001 (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2004).

1.2 Histórico do Vírus Influenza

O nome “influenza” é a forma italiana do latim *influenzia* que se utilizou no século XV (MURPHY & WEBSTER, 1996). No século passado, houve quatro grandes pandemias IVA: 1918 H1N1 da gripe "espanhola", a gripe "asiática" H2N2 em 1957, o H3N2 da gripe "Hong Kong", em 1968, e, mais recentemente, uma pandemia de gripe H1N1 (H1N1pdm) em 2009 (WEBSTER & GOVORKOVA, 2014).

Estima-se que tenham ocorrido mais de 200.000 óbitos em durante os 12 meses iniciais da pandemia de H1N1 em 2009 (DAWOODS, 2012). Foi

inicialmente diagnosticada no México, em abril do mesmo ano, e espalhou-se rapidamente, sendo que já em junho a Organização Mundial da Saúde elevou o alerta de pandemia para o nível máximo – nível 6 (GIRARD et al, 2010). Segundo a atualização nº 77 da OMS, até 29 de novembro de 2009, um total de 207 países e territórios notificaram casos confirmados laboratorialmente de influenza pandêmica H1N1/2009, incluindo 8.768 óbitos. No comparativo de 15 países com maior número de óbitos, o Brasil estava na 6ª posição na taxa de mortalidade. Até novembro de 2009, foram confirmados laboratorialmente 24.729 casos de influenza no Brasil, sendo que 91% pela influenza pandêmica H1N1/2009 e 9% (2.164/24.729) pela influenza sazonal; no Canadá, a proporção foi de 97% e nos EUA de 99%. A taxa de incidência por Influenza pandêmica H1N1/2009 foi de 12 casos para cada 100 mil habitantes (BRASIL, 2010). Na data de 18 de abril de 2010, 214 países já possuíam casos confirmados de contaminação pelo vírus. No ano de 2010, a OMS declarou o fim da pandemia de influenza A H1N1/2009, mas sabe-se que o vírus continua a circular como vírus sazonal.

1.3 Caracterização do Vírus Influenza

A característica do vírus influenza em sofrer variações antigênicas frequentes e imprevisíveis, o coloca em posição de destaque entre as doenças emergentes (COX, 1998). O vírus Influenza é também denominado de *Myxovirus influenzae* e pertence à família *Orthomyxoviridae* (SHOPE, 1931) são partículas envelopadas de RNA de fita segmentada simples e sentido negativo (JONG et al, 2000) e subdividem-se em três subtipos A, B e C, do qual os subtipos A e B são mais relevantes em humanos, mas infectam animais também. E o subtipo C, exclusivo em humanos, mas não é relevante. Dentre os três, o vírus da Influenza A é o que apresenta a maior variabilidade e o maior potencial infeccioso (FORREST & WEBSTER, 2010; MCHARDY, 2009; SULLIVAN et al., 2009; SHOPE, 1931). Isto justifica o fato do vírus influenza causar epidemias anuais recorrentes e com menos frequência às pandemias.

O vírus influenza A, com sua alta capacidade de adaptação induz a altas taxas de mutação durante a fase de replicação, sendo subdivididos e classificados de acordo com as diferenças de suas glicoproteínas de superfície,

denominadas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Atualmente, é conhecida 16 variantes de hemaglutinina (HA) e 9 variantes de neuraminidase (NA) (CUNHA, 2004). O que permite caracterizar as diferentes cepas isoladas é as variantes antigênicas da HA e da NA, alguns subtipos são conhecidos, como H1N1, H2N2, H3N2, ocorrem na forma de epidemias em seres humanos (LAMB E KRUG, 2001; NICHOLSON et al., 1998).

As cepas de vírus influenza coletadas nas várias regiões do globo são classificadas e catalogadas por intermédio de um código oficial da OMS que se baseia em: gênero do vírus (A, B ou C); localização geográfica do primeiro isolamento (p.e. Califórnia, Texas, Taiwan, Beijing ou Sydney); número da linhagem, ano e o subtipo da linhagem viral (HANNOUM, 1995). Assim, 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. Como também, a cepa A/Califórnia/04/2009(H1N1), por ter a linhagem de influenza A H1N1 causadora da pandemia de 2009 ter sido isolada na Califórnia, em meados de 2009 (NICHOLSON et al., 1998; MCHARDY, 2009).

Além das glicoproteínas (HA e NA) há proteínas que os segmentos de RNA do vírus influenza A codificam, desempenhando na célula infectada o papel de RNA mensageiro, por apresentar polaridade negativa à fita de RNA complementar ao genoma: três polimerases (PB1, PB2 e PA), nucleoproteína (NP), proteínas da matriz M1) e canal iônico (M2), e proteínas não-estruturais (NS1 e NS2) (Figura 1). Os vírus Influenza 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 (Tabela 1).

Tabela 1: Características do vírus influenza: subtipos A, B e C.

	INFLUENZA A	INFLUENZA B	INFLUENZA C
Genoma	8 segmentos	8 segmentos	7 segmentos
Estrutura	11 proteínas	11 proteínas	9 proteínas
Hospedeiro	Humanos, animais	Humanos	Humanos, suínos
Evolução genética	Antigenic shift e drift	Antigenic drift	Antigenic drift

Fonte: Adaptado do Consenso para o Tratamento e Profilaxia da Influenza (Gripe) no Brasil, Almeida F.J. e colaboradores.

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) (MOTTA, 2002). A hemaglutinina (HA) que possibilita a ligação do vírus aos receptores de ácido siálico da célula hospedeira e a fusão entre as membranas viral e endossomal para a entrada do vírus na célula; as polimerases básica 1 (PB1), básica 2 (PB2) e ácida (PA) e a nucleoproteína (NP), responsáveis pela replicação e transcrição do RNA viral; a proteína da matriz (M1), que preenche o interior viral que lhe confere rigidez; e a proteína neuraminidase (NA) que é responsável pela saída do vírus da célula, removendo dos receptores celulares as glicoproteínas (hemaglutininas) de superfície do vírus.

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 transmembrana 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).

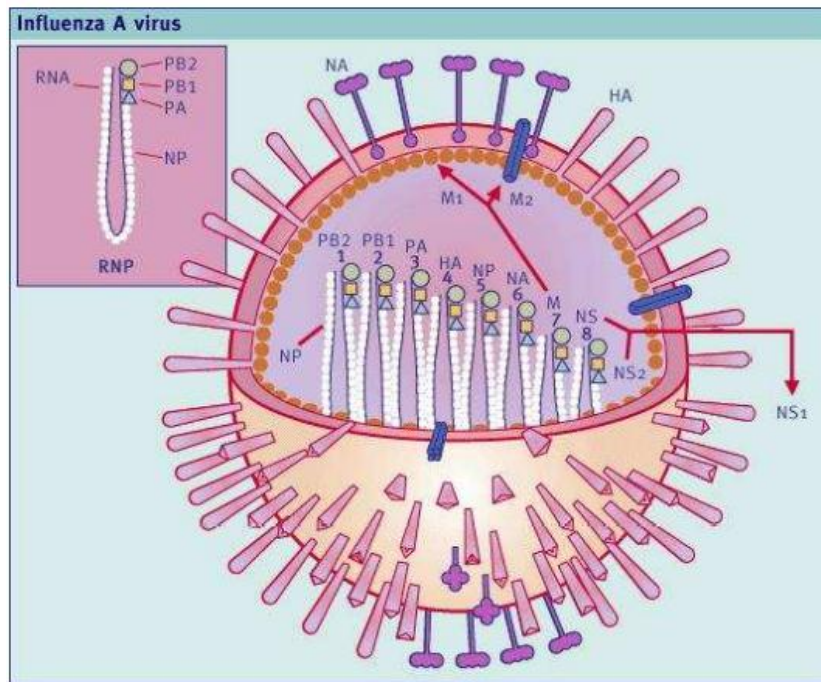


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do vírus da influenza, com a visualização das proteínas hemaglutinina (HÁ), neuraminidase (NA) e M2 (canal iônico), membrana, complexo da RNA polimerase (M1) e complexo de nucleoproteína (NP e RNP), além de todos os genes (números 1 a 8) que compõem o vírus da influenza A e B. Nota: Adaptado (<http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/img0002.jpg>)

1.4 Variações antigênicas

As constantes variações do vírus influenza ocorrem devido à sua capacidade de sofrer adaptações, tais variações se devem a mutações pontuais nos segmentos do genoma viral que resultam em mudanças nos aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície, particularmente na hemaglutinina. Surgem, então, novas variantes virais capazes de escapar da imunidade estimulada por infecção ou vacinação (COX et al., 1998; COX et al., 1999). Podendo ser menos acentuadas, (“Drift antigênico”) que ocorrem, em média, a cada dois a três anos, que é o que causa as epidemias localizadas (Influenza A e B), ou a capacidade de rearranjar oito segmentos do RNA viral (“Shift antigênico”), que em geral ocorre com o vírus da Influenza do tipo A (Figura 2). Esse rearranjo acontece em média a cada dez anos, e está associado com as pandemias (BEBY-DEFAUX et al., 2003).

As variações antigênicas maiores são aquelas associadas à completa substituição de um ou de todos os segmentos do genoma viral, que controlam a produção de glicoproteínas de superfície ocasionando a mudança em seus aminoácidos. Essas alterações se devem ao reagrupamento entre vírus humanos e vírus que infectam outras espécies animais, e estão relacionadas com a segmentação do material genético que facilita sua recombinação com o material genético de outros vírus influenza sempre que ocorrem infecções mistas (FORLEO-NETO, 2003). Quando ocorrem grandes variações antigênicas, a maioria da população não tem imunidade para os novos vírus e a doença dissemina-se rapidamente, afetando indivíduos de todas as faixas etárias. Uma das dificuldades para o controle da disseminação dos vírus influenza se dá pela existência de diversos reservatórios animais, especialmente aves e mamíferos, possibilitando o reagrupamento entre genes de vírus que infectam seres humanos e animais. Estes fatores explicam, a grande capacidade deste vírus em causar frequentes epidemias nas populações atingidas, pois o impacto das epidemias de influenza é reflexo da interação entre a variação antigênica viral, o nível de proteção da população para as cepas circulantes e o grau de virulência dos vírus.

Essas alterações decorrem do reagrupamento entre o vírus circulante em humanos e aquele que infecta diferente espécie de animais, gerando uma recombinação.



Figura 2: Mutações antigênicas; pequenas mutações (antigenic drift) e a formação de novas cepas originando novas linhagens (antigenic shift). Nota: Adaptado: Dissertação de Mestrado de Ronaldo Ferreira Dias, 2011.

Quando dois vírus influenza de linhagens diferentes entram na mesma célula, o rearranjo é um possível mecanismo de atuação do vírus com apenas algumas combinações geram vírus viáveis capazes de serem transmitidos (DAWOODS, 2012). Um exemplo disto é o subtipo da influenza H1N1 aviário que passou a circular tanto em humanos quanto em porcos, surgindo novas linhagens infectantes.

Portanto, a taxa de mutação elevada, resulta em uma variação antigênica significativa na hemaglutinina imunodominante (HA) e proteínas (NA) da neuraminidase. Devido ao seu genoma segmentado, pode sofrer rearranjo genético (os deslocamentos antigênicos), resultando em novas cepas com o potencial de transmitir rapidamente entre os seres humanos, e assim provocar uma nova pandemia.

1.5 Transmissão

O vírus influenza é de fácil transmissão e de distribuição global o que causa rápidas infecções. Sua transmissão ocorre pelo contato direto com o indivíduo doente, através de secreções respiratórias contendo o vírus, os quais são espalhados por pequenas partículas de aerossol expelidas ao falar, ao espirrar ou tossir, e a inalação destes aerossóis leva a sua disseminação a indivíduos susceptíveis (BEBY-DEFAUX et al., 2003; HAYDEN & PALESE, 1997; CHAKRAVERTY et al., 1986).

Após o contato com o vírus, o período de incubação é um a quatro dias, caracterizada como doença autolimitada, porém uma vez infectado o vírus vai aos pulmões, onde se replica nas células epiteliais colunares do trato respiratório e, a partir deste local se mistura às secreções respiratórias, podendo assim infectar outras pessoas. Outra forma de transmissão é por meio das mãos, após contato com superfícies recentemente contaminadas por secreções respiratórias de um indivíduo infectado, as mãos podem carregar o agente infeccioso diretamente para a boca, nariz e olhos (Ministério da Saúde, 2009).

1.6 Manifestações clínicas

Em sua maioria é caracterizada por um quadro agudo e autolimitada, podendo comprometer as vias áreas superiores e inferiores (MONTTO, 1995).

Entre os sintomas que caracteriza a infecção por vírus influenza, esta a instalação abrupta de febre alta, em geral acima de 38°C, com duração de 1 a 3 dias e pico nas primeiras 24 horas. Também são observadas as manifestações clínicas como mialgia, secreção nasal, dor de garganta, prostração, dor de cabeça e tosse seca, e em menor frequência náuseas, dores abdominais e diarreia (NICHOLSON, 1998). A presença de febre acompanhada de manifestações respiratórias e sintomas sistêmicos auxilia muito na distinção da influenza de outras infecções respiratórias como o resfriado comum, porém não são suficientemente específicos para um diagnóstico totalmente seguro sem confirmação laboratorial apenas pela apresentação clínica dos pacientes (CDC, 2001). O que permite um controle adequado da infecção, incluindo o início da terapia antiviral, quando possível, medidas de suporte para os pacientes com maior risco de complicações ou até medidas de controle de infecção para os hospitalizados.

Nas pessoas saudáveis, a presença dos sintomas tem duração de uma a duas semanas, e as consequências da mesma são geralmente moderadas. Por outro lado, o impacto em idosos ou indivíduos portadores de doenças crônicas pode ser mais grave, resultando muitas vezes no desenvolvimento de pneumonia viral e bacteriana, ou há agravamentos da saúde tendo a necessidade de hospitalização (OXFORD, 1998).

A infecção por vírus respiratório agudo severo pode induzir síndrome da doença respiratória do adulto (SARA), que está associada com disfunção epitelial-endotelial significativa e excessiva, capazes de induzir uma forte resposta inflamatória, que causa danos significativos nos pulmões e a reestruturação definitiva da arquitetura pulmonar. (SHORT et al., 2014).

1.6 Epidemiologia e Vigilância Epidemiológica

Vírus da gripe é um agente respiratório altamente contagioso que afeta indivíduos de todas as idades e desempenha um importante papel a nível

mundial, causando epidemias, principalmente durante o outono e inverno (FALSEY et al., 1995). Ele conduz eventualmente a pandemias que são responsáveis por um grande número de mortes (COX et al., 1999). De acordo com dados do Centro para o Controle e Prevenção de Doenças, a gripe e suas complicações são a sexta causa de morte entre as crianças mais jovens de 4 anos. Além disso, 114 mil pessoas são hospitalizadas e 36.000 pessoas morrem nos Estados Unidos todos os anos (DAWOODS, 2012).

Diversos estudos em todo o mundo têm destacado a importância dos vírus nas infecções respiratórias agudas, o qual acomete todas as faixas etárias, com diferentes quadros clínicos e níveis de gravidade. Tanto a taxa de morbidade quanto à mortalidade podem variar ano a ano dependendo de fatores virais do influenza, como as cepas circulantes, o grau de imunidade da população geral e da população mais suscetível, entre outros.

Estudos mostram diferença na sazonalidade do vírus identificado, como, na região de clima temperado a incidência global IRAs virais aumenta nos meses de inverno, e nas regiões de climas tropicais há maior incidência nos meses mais chuvosos, devido a sua alta umidade (KIM et al., 2000; ARRUDA et al., 1991; MOURA et al., 2003).

Em decorrência às epidemias anuais de gripe e ao risco de novas pandemias, o monitoramento epidemiológico do vírus influenza é de fundamental importância. Iniciada em 1947, a rede de vigilância epidemiológica da gripe coordenada pela OMS inclui atualmente cerca de 110 Laboratórios Nacionais de Influenza distribuídos em 80 países, apoiados por quatro Centros de Referência localizados em Londres, Atlanta, Melbourne e Tóquio (HANNOUN, 1995).

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). Um comitê reúne-se na OMS duas vezes ao ano para formalizar a recomendação das cepas do vírus influenza a ser incluídas na composição da vacina, para que se obtenha a formulação adequada para a próxima temporada de gripe. Desde 1977, a recomendação para a composição da vacina contra gripe tem

incluído três cepas virais: duas do tipo A, respectivamente dos subtipos H1N1 e H3N2, e uma do tipo B (OMS, 2000).

No Brasil existem três grandes institutos que se integram a esta rede de vigilância de influenza: 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. A rede foi ampliada com a adesão de LACEN de vários estados. Mesmo assim, vigilância da influenza no Brasil apresenta alguns obstáculos, como abrangência ainda limitada das unidades sentinelas. (Rede Nacional de Vigilância da Influenza, parte do Ministério da Saúde).

A vigilância epidemiológica no Brasil se faz por unidades sentinelas distribuídas em todas as regiões do país, e de acordo com o Boletim Epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, os dados mais recentes do monitoramento de 2014 são até a 13ª Semana Epidemiológica. De 3097 amostras coletadas, 310 (10%) tiveram resultado positivo para influenza ou outros vírus respiratórios, sendo 52 positivas para influenza A(H3N2), 29 para influenza A não identificado o subtipo, 16 para influenza B e 12 para influenza A(H1N1)pdm09, dados retirados do Boletim Epidemiológico, 2013.

Em relação à distribuição geográfica, a região Sudeste registrou o maior número de casos de SRAG confirmados por influenza, representando 84,9% (62/73) do total de casos notificados no país, com destaque para o estado de São Paulo (40). Nessa região, predominaram os casos de influenza A(H3N2) (28) e A(H1N1)pdm09 (15) (OMS, 2014).

Quanto aos óbitos foram notificados 205 óbitos por SRAG, dos quais 2,9% (06) foram confirmados para o vírus influenza, 03 para o vírus influenza A(H3N2), 01 para influenza A(H1N1)pdm09, 01 para influenza A sem identificação do subtipo e 01 para influenza B. Os óbitos por influenza ocorreram em indivíduos residentes em Minas Gerais (04), Rio de Janeiro (01) e Mato Grosso do Sul (01). A idade dos indivíduos que evoluíram para óbito por influenza, variou de 18 a 80 anos, com mediana de 55 anos. Destes, a maioria (04) possuía pelo menos um fator de risco para complicação: idoso (03), pneumopatias crônicas (03), diabetes mellitus (02) e doença cardiovascular crônica (02) (OMS, 2014).

No Paraná, o monitoramento das doenças respiratórias da Secretaria da Saúde Estadual é realizado através do Centro de Informação e Respostas Estratégicas de Vigilância em Saúde (CIEVS) ou pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN). A figura 3 demonstra a distribuição das doenças respiratórias por faixa etária no Paraná no ano de 2013.

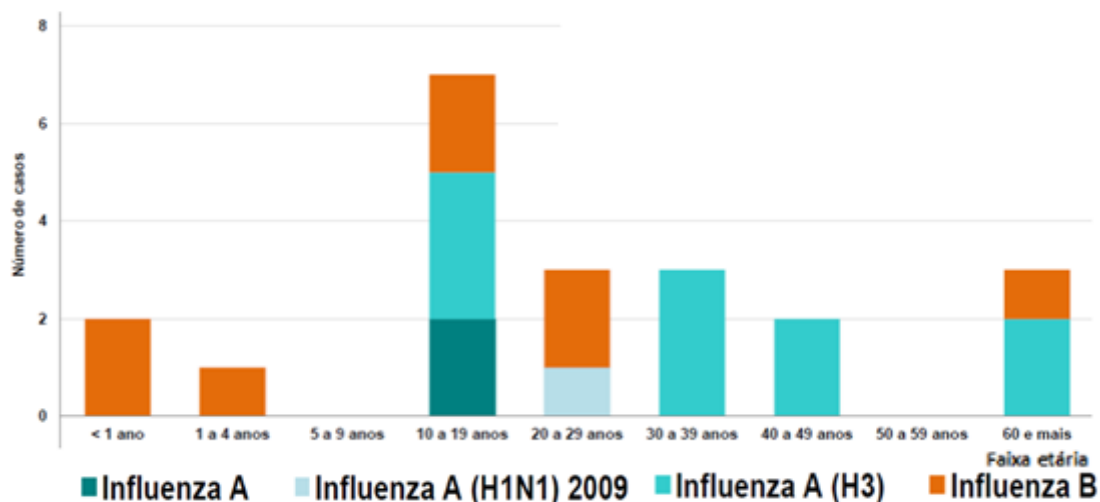


Figura 3: Monitoramento das doenças Respiratórias pelo número de casos de influenza por subtipo, por faixa etária no Paraná, no ano de 2013. Nota: Adaptado (Secretaria de Saúde).

1.7 Imunização

O estudo da gravidade e do risco do vírus da gripe em crianças é fundamental para a indicação e adoção de medidas de controle da doença, tais como imunização. As medidas preventivas são extremamente importantes para conter epidemias de gripe. Um deles, que tem mostrado um grande impacto é a vacina multivalente formulada anualmente com os tipos e estirpes selecionadas pelo vírus da gripe (ATSUSHI et al., 2014).

As vacinas contra influenza são inativadas, compostas por fragmentos ou subunidades proteicas virais e, portanto, incapazes de causar gripe. Após a vacinação, as reações adversas mais frequentes ocorrem no sítio de aplicação da vacina, como dor e vermelhidão no local da injeção, presentes em até 15% dos vacinados. Tais reações são autolimitadas (24-48 horas) e habitualmente

não impedem o indivíduo de mover o braço ou realizar suas atividades rotineiras. No entanto, apesar da clara evidência de que imunização reduz o risco de infecção, a vacina é aplicada para os pacientes que pertencem aos grupos de risco (BLOOM, 2010).

A Campanha de Vacinação preconizada pelo MS visa um público alvo para a imunização sendo formados por crianças de seis meses à menores de cinco anos, pessoas com 60 anos ou mais, profissionais de saúde, povos indígenas, gestantes, puérperas (até 45 dias após o parto), funcionários do sistema prisional e pessoas portadoras de doenças crônicas não transmissíveis, pois estas pessoas são mais vulneráveis a desenvolver a forma grave da doença (BINNICKER, 2015).

A maioria das crianças hospitalizadas pelo vírus influenza não pertencem aos grupos de risco específicos direcionados por recomendações atuais, um terço são mais jovens de 6 meses de idade. O alvo de vacinação para a população precisa ser reexaminado (MARTIN et al., 2013).

Segundo o Ministério da Saúde, no ano de 2014, a meta de vacinação contra a gripe foi superada com uma cobertura vacinal de 86,32%, mais de 43 milhões de pessoas foram vacinadas. A vacina é uma importante ação de prevenção da gripe, mas não dispensa medidas básicas de proteção, como lavar as mãos várias vezes ao dia, cobrir o nariz e a boca ao tossir e espirrar, evitar tocar o rosto e não compartilhar objetos de uso pessoal.

Com a imunização contra influenza ocorre benefícios econômicos e sociais, diminuindo as consultas médicas nos postos de atenção primária a saúde e quando utilizada em trabalhadores sadios evitando assim a ausência no trabalho ou a sua queda da produtividade relacionados aos surtos anuais de influenza.

Há também os medicamentos antivirais que são uma linha de defesa contra o surgimento de cepas novas. Atualmente, duas classes principais de medicamentos antivirais são aprovados para o tratamento de pacientes infectados: a primeira classe de medicamentos antivirais como alvo o canal de íon M2 (amantadanes), o que é importante para desencapsulamento do vírus. No entanto, amantadanes já não são recomendados para a profilaxia ou tratamento devido à resistência generalizada entre H1N1e H3N2 isolados (HAY et al., 1985; STIVER, 2003; DAVIES et al., 1964). A segunda classe de

medicamentos antivirais tem como alvo o local enzimático ativo da NA proteínas da neuraminidase viral. Estes com ação inibitória, porém de eficácia limitada, devido à necessidade de administração precoce (dentro de 48 h da apresentação de sintomas) para sua eficácia máxima (WATHEN et al., 2013; SAMSON et al., 2013; BLOOM et al., 2010; STORMS et al., 2012).

1.8 Diagnóstico

Apenas através das características clínicas apresentadas pelo paciente não é suficiente para confirmar uma infecção por influenza visto que o quadro clínico é similar aos outros vírus respiratórios, tendo necessidade da suspeita clínica ser confirmada por um diagnóstico laboratorial.

Dentre alguns diagnósticos o isolamento viral em cultura de células é considerado o padrão-ouro, pois permite a recuperação de cepas virais para posterior análise genética e antigênica (OSTERHAUS et al., 2008). Outra metodologia de diagnóstico aplicados nos laboratórios de virologia clínica é a cultura rápida (BEBY-DEFAUX et al., 2003), havendo os testes de detecção de proteína viral podem ser realizados por imunofluorescência (IF) ou por uma reação enzimática (enzimaimunoensaio) ou pelo acúmulo de partículas coloridas (imunocromatográfico) classificados como testes rápidos (BRYCE et al., 2005).

Lembrando que os procedimentos apropriados de coleta, transporte, processamento e armazenamento de espécimes são de fundamental importância no diagnóstico da infecção viral.

As técnicas de amplificação do ácido nucléico (Polymerase Chain Reaction – “PCR”), usadas no diagnóstico de viroses respiratórias têm se apresentado com desempenho de alta sensibilidade e especificidade, sendo uma técnica rápida, podendo identificar até mesmo linhagens mutantes resistentes a agentes antivirais. Mas para ocorrer um bom desempenho deste teste é preciso levar em conta os métodos: de extração de ácidos nucléicos, genes virais utilizados como alvo da detecção e variações na tecnologia de amplificação e sua detecção (CHOUDHARY et al., 2015).

O diagnóstico de vírus respiratórios com base no isolamento do vírus, a detecção de antígenos ou sorologia é muito demorado e, em alguns casos, tem baixa sensibilidade (BECKMANN et al., 2015). Portanto, métodos moleculares de diagnóstico ou técnicas disponíveis comercialmente são alternativas para a obtenção de resultados mais rápidos e maior sensibilidade e especificidade. Esses métodos moleculares podem, potencialmente, reduzir a duração dos hospitalizados e os custos de tratamento desnecessários; além disso, eles também podem contribuir para os programas de controle de infecção hospitalar

e podem ajudar a orientar a terapia (JANSEN et al., 2007; PECCHINI et al., 2008).

O diagnóstico laboratorial das infecções respiratórias agudas virais é normalmente realizado através de técnicas convencionais, tais como testes de cultura ou de detecção de antígeno, com as limitações relacionadas com o atraso dos resultados e a disponibilidade de anticorpos monoclonais para o vírus recentemente identificado (ALLANDER et al., 2005). Os ensaios de PCR tornaram-se uma importante ferramenta para a identificação de agentes etiológicos nas IRA (BINNICKER et al., 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a ocorrência da infecção respiratória aguda causada pelo Vírus Influenza em indivíduos sintomáticos nos atendimentos de serviço de assistência primária a saúde pública na cidade de Guarapuava-Paraná.

2.2 Objetivos Específicos

a) Descrever o perfil epidemiológico e demográfico dos casos de pacientes com doenças respiratórias aguda atendidos em serviço primário de saúde público de Guarapuava.

b) Padronizar a metodologia de RT-PCR para a detecção de Influenza A e B em amostras de secreção nasal;

c) Investigar a ocorrência de infecção respiratória aguda por Influenza e descrever a apresentação clínica e possíveis fatores de risco.

3. METODOLOGIA

3.1 População do Estudo

Para o presente estudo foram utilizadas amostras de 144 pacientes que referiam sintomas respiratórios agudos, no período de abril de 2013 a setembro de 2014, que foram atendidos no Posto de Saúde Vila Carli de assistência à saúde básica.

Este local foi escolhido para o estudo por tratar-se de serviço de assistência primária à saúde, situado na cidade de Guarapuava-PR. A inclusão dos casos ocorreu por declaração espontânea de sintomas respiratórios agudos aos pesquisadores.

O município de Guarapuava está localizado na região centro-oeste do estado do Paraná, tem uma superfície de 3.177,598 Km² e encontra-se a uma altitude média de 1098 m. O município possui uma população estimada em 175.779 habitantes em 2013, sendo essencialmente urbano, onde cerca de 90% da sua população reside. O clima do município é subtropical úmido, com temperatura média anual de 16°C e com precipitação anual de 1.653,7mm. O índice de desenvolvimento humano é 0,731, esta em 78º lugar no ranking do estado (IPARDES, 2013).

A região de Guarapuava se caracteriza por apresentar clima Subtropical Mesotérmico Úmido, tendo como principais características a ocorrência de verões frescos (temperatura média inferior a 22°C), invernos com eventos de geadas severas e frequentes (temperatura média superior a 3°C e inferior a 18°C) e a ausência de estação seca. A precipitação média anual da região é de aproximadamente 1800 mm.

3.2 Coleta das Amostras

A inclusão dos indivíduos no estudo foi quanto à ocorrência de doença respiratória aguda com sintomas de gripe ou resfriado e que concordaram em coletar amostras de secreção nasal ou nasofaríngea de casos suspeitos.

A coleta das amostras foi realizada durante os anos de 2013 e 2014, houve a procura de pacientes durante o ano todo pelos pesquisadores, no

entanto nos meses de abril a setembro de ambos os anos, encontrou-se um número maior de pacientes. No momento da coleta da amostra clínica para a detecção do agente etiológico em laboratório, um pesquisador da equipe abordou e explicou sobre o projeto para os participantes ou pais responsáveis, quando criança, e após sua concordância na participação do estudo e assinatura que foi formalizada através de um consentimento livre e esclarecido (Anexo 1), Cada paciente incluído no estudo foi questionado pelo pesquisador quanto aos sintomas clínicos apresentados, além dos dados demográficos e fatores de risco associados à complicação da infecção pelo RSV considerados relevantes para o estudo, estes foram relatados no questionário pelo pesquisador (Anexo 2).

Quanto ao quadro clínico, foram investigados: o tempo de início do quadro respiratório, sintomas; quais os sintomas respiratórios em geral tais como febre, coriza, tosse, dor de garganta, cefaléia, mialgia e calafrios; a presença de co-morbidades como diabetes, hipertensão arterial, tabagismo, asma, doenças metabólicas, cardiopatias e gestação; também foi questionado aos pacientes quanto às terapias farmacológicas utilizadas e se houve imunização prévia para o vírus influenza. Esses dados foram relatados pelos participantes ao pesquisador do estudo no momento da coleta da amostra.

As amostras foram obtidas utilizando a técnica de swab nasal, que consiste em inserir o swab (swab de Rayon) cerca de 2-3 cm na narina do paciente, fazendo movimentos circulares em suas paredes. Após, o swab foi acondicionado em tubo tipo Falcon com 2ml de soro fisiológico a 0,9% de salina, e devidamente identificados, sendo mantido em temperatura de refrigeração (4° a 8°C) e encaminhado ao Laboratório de Virologia da UNICENTRO, logo em seguida.

3.3 Processamento do Material Clínico

O material colhido foi transportado até o laboratório sob refrigeração (4°C) sendo processado no mesmo dia em cabine de segurança, e mantido sempre em gelo. O tubo Falcon foi agitado em vórtex, por aproximadamente 1 minuto e o swab foi retirado.

A seguir, a amostra foi estocada em freezer -70°C para a realização dos ensaios moleculares.

3.4 Extração dos Ácidos Nucleicos

Primeiramente, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e homogeneizadas no vórtex por aproximadamente 1 minuto. Após, 200 μL da amostra nasal foi utilizado para a extração do RNA viral usando o kit QIAamp RNA viral kit (Qiagen GmbH., Alemanha), conforme as instruções do fabricante.

3.5 Cepas Controles

As cepas controles foram cedidas gentilmente pela Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo Laboratório de Virologia. E as cepas são: Influenza A/NewCaledonia/20/99 (H1N1), InfluenzaA/Panama/2007/99 (H3N2) e Influenza B/HongKong/33/01.

3.6 Transcrição Reversa – RT

Para cada amostra foi gerado o cDNA (ácido dessorribonucléico complementar), inicialmente através da mistura de 10 μL de RNA e 1 μL da solução de oligonucleotídeos randômicos a 200ng/ μL (Random Primer, Invitrogen, EUA) aquecidos a 80°C por 10 minutos, com posterior resfriamento a 4°C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionada a mistura de reagentes para a transcrição reversa (tabela 1), constituída por água de grau molecular (equipamento MiliQ, Millipore, EUA), MgCl_2 (Invitrogen, EUA), tampão concentrado 5 vezes (250mM Tris-HCl, pH8,3, 375mM KCl, 15mM MgCl_2) desoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs) a 20Mm de dATP, dTTP, dCTP, dGTP, enzima transcriptase reversa “Moloney Murine Leukemia Virus” (MMLV-RT) (Invitrogen, EUA) e inibidor de RNase (Invitrogen, EUA) para um volume final de 25 μL . Após a homogeneização, a síntese do cDNA foi realizada em termociclador Multigene TC 9600G (Labnet Laboratory, EUA) a 42°C durante 60 minutos, seguido de inativação a 72°C por 15 minutos. Após este

procedimento, as amostras foram submetidas a ciclos da PCR para amplificação dos genes do vírus Influenza A e B, separadamente.

Tabela 2: Reagentes utilizados na reação da Transcrição Reversa (RT).

Componentes	Concentração inicial	Volume da reação inicial
Água Mili-Q	-	4,5 µL
Tampão	5X	5µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50Mm	2 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, Dctp	20mM	1 µL
Rnase Out inibitor (Invitrogen®)	40U/µL	0,5 µL
MML-V (Invitrogen®)	200U/µL	1 µL

3.7 Amplificação da Reação em Cadeia da Polimerase

A reação de amplificação em cadeia da polimerase (PCR) do DNA complementar ao molde inicial resultante da primeira etapa (cDNA) foi realizada no mesmo tubo com a adição de uma segunda mistura contendo 20mM de dNTPs, 5U da enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Brasil), 1µL de cada um dos iniciadores senso (MR e NSR) na concentração de 0,5µg/µL, conforme mostra na tabela 3 abaixo, completando o volume final da reação para 50µL com água grau molecular.

Tabela 3: Reagentes utilizados na reação da amplificação da PCR.

Componentes	Concentração inicial	Volume inicial
Água Mili-Q	-	9,5 µL
Tampão	10X	2,5µL
MgCl ₂ (Invitrogen®)	50mM	1,25 µL
dNTP: dATP, dTTP, dGTP, dCTP	20mM	0,25 µL
Primer MF	10µM	0,5 µL
Primer MR	10µM	0,5 µL
TAQ DNA polymerase (Invitrogen, Brasil®)	5U/µL	0,5µL
cDNA	----	10µL

Os iniciadores específicos usados nesse estudo para a detecção de Influenza A foram os mesmos descritos e validados em estudo anterior por Cooper e Subbarao (2000) e têm como alvo o gene codificador da proteína estrutural da matriz viral M (nucleotídeos 149 a 847). As seqüências dos iniciadores senso e anti-senso são: MF, 5'- CTC ATG GAA TGG CTA AAG ACA -3'; e MR, 5'- CGA TCA AG/TA ATC CAC AAT ATC -3'. Os iniciadores utilizados para a detecção do vírus influenza B serão inicialmente descritos e validados por Poddar (2002) e amplificam parte do gene não estrutural NS (nucleotídeos 37 a 145). As seqüências desses iniciadores senso e anti-senso são: NSF, 5'- ACA AAT TGA GGT GGG TCC G -3'; e NSR, 5'-GGC AAG TGC ACC AGC AGA ATA ACT -3', mostra-se na tabela 4.

A reação de amplificação foi realizada em termociclador Multigene TC 9600G (Labnet Laboratory, EUA), com um passo inicial de 94°C por 1 minuto, seguido de 35 ciclos de desnaturação do DNA a 94°C por 45 segundos, hibridização dos iniciadores a 50°C por 30 segundos e síntese do DNA a 72°C por 1 minuto. No último passo, a amplificação foi completada com a extensão do tempo de síntese a 72°C por 7 minutos. Controles positivos (Influenza A/NewCaledonia/20/99 H1N1, Influenza A/Panama/2007/99 H3N2 e Influenza B/HongKong/33/01) e negativos (água grau molecular) foram incluídos em cada série de reações.

Tabela 4: Sequência dos oligonucleotídeos primers utilizados para amplificação do Influenza A e B.

Primers	Sequência (5'-3')	Referência
MF	CTC ATG GAA TGG CTA AAG ACA	Cooper e
MR	CGA TCA AG/TA ATC CAC AAT ATC	Subbarao (2000)
	(nucleotídeos 149pb a 847pb)	Influenza A
NSF	ACA AAT TGA GGT GGG TCC G	
NSR	GGC AAG TGC ACC AGC AGA ATA ACT	Poddar (2002)
	(nucleotídeos 37pb a 145pb)	Influenza B

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase utilizando o PCR SuperMix®

Para a detecção do Vírus Influenza A e B foi realizada a reação com o PCR SuperMix® (Invitrogen, Life Technologies- Brasil), que é um mix de reagente prontos contendo Mg^{2+} , dNTPs e *Taq* DNA polymerase recombinante em concentrações suficientes para permitir a amplificação do vírus durante a PCR (LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION, 2010).

Para a reação de amplificação foram utilizados 5 μ L de cDNA e 20 μ L dos componentes da reação, demonstrado na tabela 3. Contendo água de grau molecular (obtida de filtro MiliQ–Millipore, EUA), PCR SuperMix® (Invitrogen- Life Technologies- Brasil), Primers Foward e Reverse, com volume final da reação de 25 μ L.

Após a homogeneização em vórtex, a amplificação foi realizada em termociclador Multigene TC 9600 G (Labnet Laboratory, EUA), as amostras foram submetidas a uma etapa de desnaturação de 94°C por 1 minuto, foram realizados 35 ciclos de amplificação de repetidas variações de temperatura: a 94°C por 45 segundos, hibridização dos iniciadores a 50°C por 30 segundos e síntese do DNA a 72°C por 1 minuto.. Em seguida, o produto desta amplificação foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,2%, por 50 minutos a 140 volts (V).

Tabela 5 - Reagentes para amplificação de Influenza utilizando um Mix de reagentes prontos PCR SuperMix®

Componentes	Concentração	Volume da reação
	Inicial	Inicial
Água Mili-Q	-	10 μ L
PCR SuperMix®	1X	8 μ L
Primer Forward	20 μ M	1,0 μ L
Primer Reverse	20 μ M	1,0 μ L

3.9 Eletroforese em Gel de Agarose

Após cada amplificação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,2%, diluído em tampão Tris/borato/EDTA - TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,0089M; EDTA 0,002M pH 8,0), contendo 0,5µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen, EUA). O gel foi preparado em cubas de eletroforese horizontal. Um volume de 7,5µl do produto amplificado foi misturado com 2,5µl da solução de corante azul de bromofenol (0,25%; xileno cianol 0,25%; glicerol 30% em água destilada) e aplicado a cada canaleta correspondente. Para cada eletroforese foi reservada a primeira canaleta para aplicação do padrão de peso molecular de 100pb a 1µg/µl (DNA Ladder, Invitrogen, EUA).

A corrida em cuba horizontal de eletroforese foi realizada utilizando como tampão de corrida TBE 0,5X (Tris 1M; ácido bórico 0,9M; EDTA 0,00M pH 8,4) a uma voltagem de 90V por 60 minutos. A análise do gel foi realizada através da visualização em transluminador de luz ultravioleta Alphamager HP (Protein Simple, EUA) utilizando o software Alphaview versão 3.4.

A diferenciação entre os tipos de influenza é realizada pela comparação com um marcador de peso molecular de 100 pares de base (pb), sendo que a banda de 698pb corresponde indica a positividade para o tipo A e de 108pb a positividade para o tipo B de Influenza.

3.9.1 Padronização da RT-PCR

A RT-PCR foi otimizado utilizando controle positivo (cepas controles) e controle negativo (água de grau molecular) e algumas variações na reação foram feitas, visando melhorar o rendimento da reação como: eficiência, sensibilidade e especificidade; com base na intensidade do brilho das bandas após a amplificação do material genético, sem o aparecimento de bandas inespecíficas.

3.9.2 Limite de Detecção

Este parâmetro foi realizado com as seguintes diluições dos RNA extraídos das amostras positivas controles: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} submetidas a RT-PCR e depois a PCR e observado no gel de agarose a maior diluição que

detectou a presença do vírus. Esta observação foi feita pela intensidade da fluorescência das bandas de 698pb, Influenza A e das bandas 108pb, Influenza B; sem a observação de bandas inespecíficas.

3.9.3 Variação na temperatura de anelamento

Foram variadas temperaturas de anelamento da PCR entre (51°C - 61°C) e logo após, os amplicons foram observados em gel de agarose pela intensidade da fluorescência, qual temperatura deu uma maior eficácia a reação.

3.9.4 Variações na Concentração do Cloreto

Concentrações de MgCl₂ também foram testadas na tentativa de favorecer a reação de PCR. O RNA extraído da amostra controle positiva usadas, foi na diluição 10⁻¹, para RT-PCR e PCR, e as concentrações de MgCl₂ testadas na PCR foram: 1,5mM; 2,0mM; 2,5mM 3,0mM ; 3,5mM.

3.9.5 Curva da enzima

Outro reagente que favorece a reação e a enzima TAQ polimerase, foi testada nas concentrações de 0,8mM; 1,0mM; 1,2 mM, com cDNA feito na diluição (10⁻¹) também na tentativa de melhorar rendimento na reação.

4 RESULTADOS

4.1 Inclusão de pacientes

Durante o estudo foram coletadas 144 amostras nasofaríngeas de pacientes de todas as faixas etárias de idade, provenientes do serviço de atendimento a saúde pública da cidade de Guarapuava- Paraná. Levando-se em consideração o gênero dos indivíduos participantes do estudo, pode-se dizer que 35 (24,31%) são do gênero masculino e 109 (75,69%) são do gênero feminino. Como demonstrado na tabela 5.

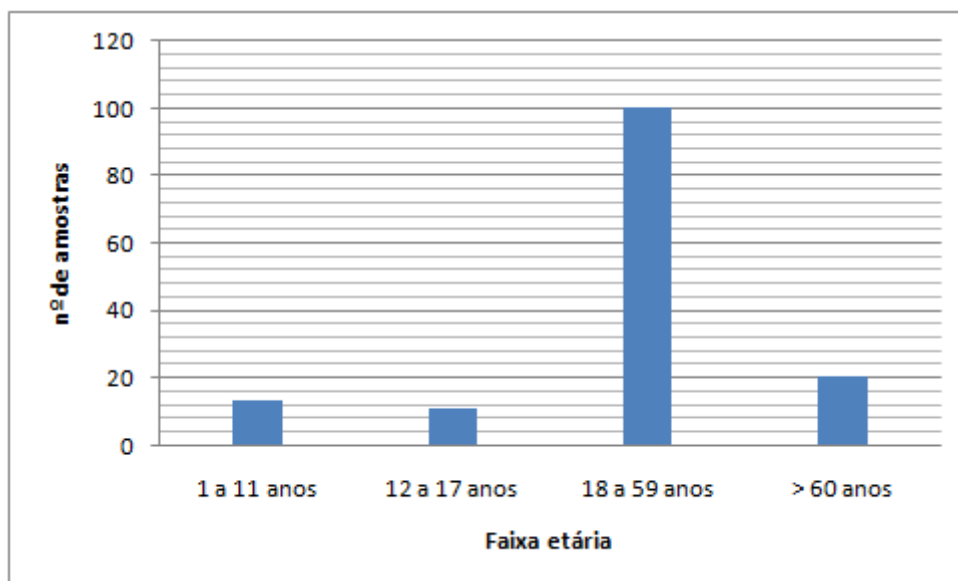
Tabela 6. Gênero e idade dos casos atendidos no Posto de Saúde Vila Carli de atenção primária à saúde na Comunidade de Guarapuava - Pr.

N	Gênero		Idade			
	Masculino (%)	Feminino (%)	Média (anos)	Mediana (anos)	Mín (anos)	Máx (anos)
*144	24,3%	75,7%	35	31	1	82

*144= Amostras de casos de infecções respiratórias

Na Figura 4, está representada a distribuição dos pacientes conforme a faixa etária dos 144 casos de infecções respiratórias, onde pode-se observar que houve um predomínio de pacientes adultos participantes do estudo, de 18 a 59 anos quando comparado a crianças, jovens e idosos.

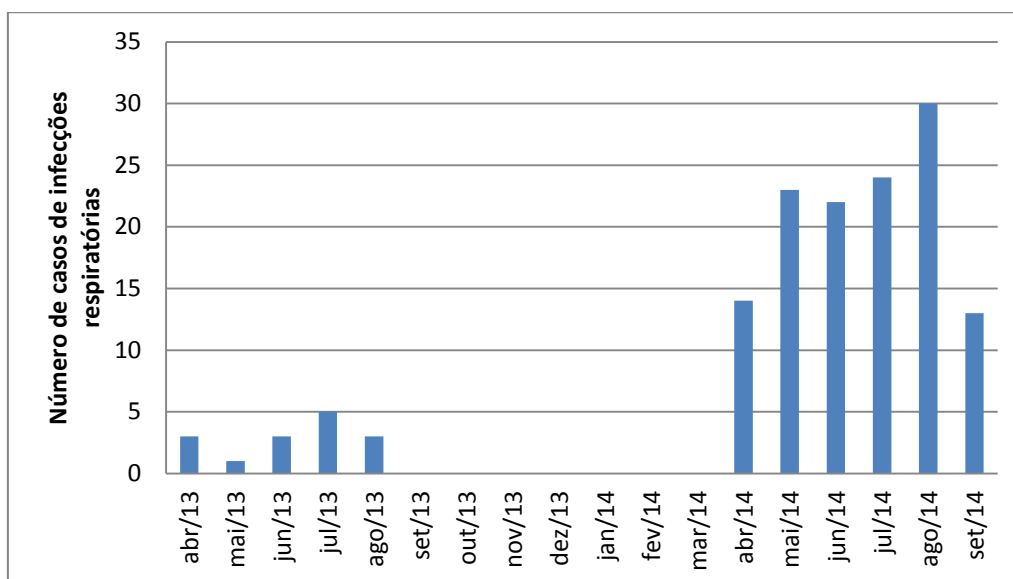
Figura 4. Distribuição dos pacientes incluídos no estudo por faixa etária.



4.2 Períodos de inclusão dos pacientes

O total de amostras incluídas no estudo foram 144, sendo que 15 foram coletadas de pacientes com sintomas de infecção respiratória atendida durante o ano de 2013 e 129 durante o ano de 2014.

O número de amostras coletadas de casos suspeitos em cada mês durante os anos de 2013 e 2014 está demonstrado na figura 5. Visto que os meses com maior número de amostras coletadas foi agosto, seguido de maio, julho e setembro do ano de 2014.

Figura 5. Distribuição mensal das amostras incluídas no estudo.

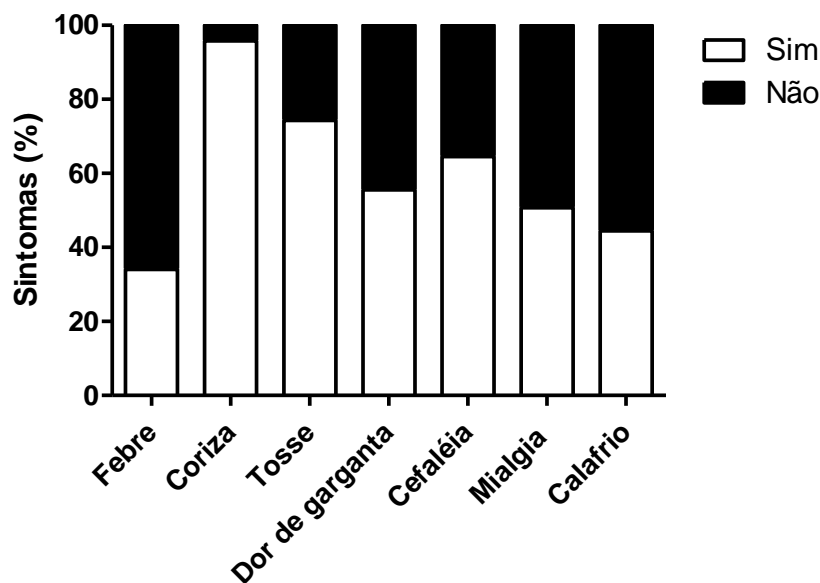
4.3 Quadro Clínico: Sintomas

A média de tempo do início dos sintomas respiratórios apresentados pelos pacientes incluídos no estudo foi de 6,46 dias e a mediana de 4 dias, variando com o mínimo de 1 dia e o máximo de 30 dias.

A figura 6 mostra os sintomas apresentados pelos 144 pacientes participantes do estudo, quando questionados sobre a ausência ou a presença de quais sintomas. Podendo-se observar que os sintomas mais característicos da infecção viral aguda nesse estudo foram coriza e tosse.

Quanto aos sintomas respiratórios: (tosse, coriza e dor de garganta) e dos sintomas gerais: (cefaleia, mialgia e calafrios), incluindo a presença de febre; observou-se que das 144 amostras nasais, o sintoma com maior frequência foi a coriza/obstrução nasal em 138 pacientes (95,83%), por seqüência a tosse (74,31%), cefaleia (64,58%), dor de garganta (55,56%), mialgia (50,69%), calafrio (44,44%) e por fim a febre (34,03%). Conforme mostra na Figura 6 abaixo.

Figura 6. Ocorrência dos sintomas respiratórios e sintomas gerais.



4.4 Comorbidades

Foi questionado aos pacientes quanto ao seu estado de saúde, informando se eram indivíduos saudáveis ou apresentavam alguma comorbidade, relatando-as para o estudo, conforme observado na tabela 7.

E em relação a presença de comorbidades, a maioria dos pacientes não relataram nenhuma doença (85/144, 59,44%). E dos 59 pacientes que se queixaram de alguma comorbidade, a mais presente nestes foi a hipertensão arterial (9,09%), em seguida não se tratando de uma doença, mas um fator primordial de risco para infecção respiratória, o tabagismo (7%), após, doenças metabólicas (7,0%), asma (2,8%), gestantes (2,1%) e casos relatados de associações de duas ou mais comorbidades juntas, totalizando (12,6%), conforme a Tabela que descreve com seu número de casos e porcentagem.

Tabela 7: Presença de comorbidades nos pacientes infectados por doenças respiratórias.

Comorbidades	N° de pacientes	%
Hipertensão	13	9,09
Tabagismo	10	6,99
Asma	4	2,80
Doenças Metabólicas	10	7,00
Cardiopatias	1	0,69
Gestantes	3	2,10
Diabetes+ hipertensão	5	3,50
Tabagismo+ metabólicas	1	0,69
Hipertensão + tabagismo	4	2,80
Diabetes + metabólicas	1	0,69
Diabetes+ hipertensão +cardiopatias	1	0,69
Hipertensão + metabólicas	1	0,69
Diabetes + tabagismo	1	0,69
Tabagismo + cardiopatias	1	0,69
Hipertensão + cardiopatias	1	0,69
Diabetes + cardiopatias	2	1,40
Sem comorbidades	85	59,44

4.5 Vacina

No momento da realização da entrevista aos pacientes, foi questionada a imunização prévia para o vírus Influenza H1N1, H3N2 e influenza B, dos respectivos anos 2013 e 2014, conforme o ano em que foram coletadas as amostras. E dos 144 pacientes, apenas 46 foram vacinados (31,94%), e 98 pacientes não tomaram a vacina (68,06%), isso ilustra na Figura abaixo:

Figura 7: Representação gráfica do número de pacientes que tiveram a imunização prévia para o vírus Influenza.

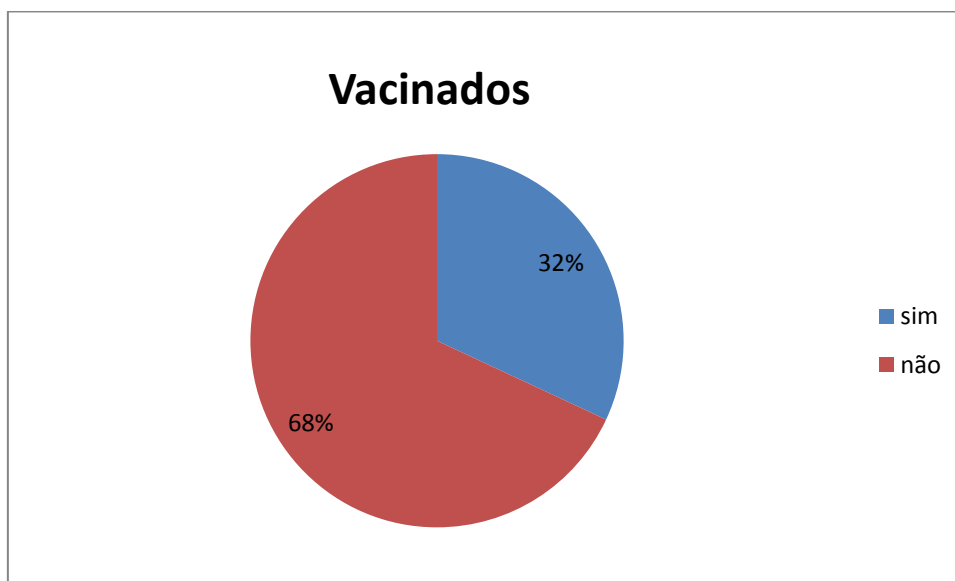


Tabela 8: Pacientes vacinados e não vacinados incluídos no estudo, de acordo com a faixa etária

Idade	Não vacinadas (n)	Vacinadas	
		N	%
1 – 11	6	7	53,84
12 – 17	8	3	27,27
18 – 59	78	22	22,0
> 60	6	14	70
Total/média	98	46	43,27

n – número de indivíduos; média – percentagem média de vacinados.

4.6 Tratamentos

E das terapias medicamentosas para aliviar os sintomas causados, podemos relatar conforme a figura 8, que dos 144 pacientes, 46 não fizeram nenhum uso de medicação, e 98 pacientes, representando 68%, tomaram algum medicamento. E destes medicamentos que tiveram uso, os mais comuns foram das seguintes classes medicamentosas; analgésicos (28), antigripais

(17), antiinflamatórios (10), entre outras associações que apresenta detalhadamente na tabela 9.

Tabela 9: Terapias medicamentosas realizadas por pacientes sintomáticos as infecções respiratórias.

Terapias Medicamentosas	N°	%
Ausência de uso de terapia	46	31,94
Analgésico	28	19,44
Antigripal	17	11,81
Anti-inflamatório	10	6,94
Analgésico/anti-inflamatório	10	6,94
Antibiótico	5	3,47
Fitoterápico	4	2,78
Antialérgico	4	2,78
Analgésico/antigripal	4	2,78
Anti-inflamatório/antibiótico	4	2,78
Anti-inflamatório/antigripal	3	2,08
Analgésico/antialérgico	2	1,39
Antigripal/antibiótico	2	1,39
Analgésico/anti-inflamatório/antigripal	1	0,69
Analg/antii/antigri/antibio/antivi	1	0,69
Analgésico/anti-inflamatório/antialérgico	1	0,69
Antibiótico/fitoterápico	1	0,69
Anti-inflamatório/antialérgico	1	0,69
SOMA	144	100,00

4.7 Padronização do ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a padronização da RT-PCR foram utilizados controles positivos para influenza A e influenza B, que foram gentilmente cedidas do Laboratório de Virologia Clínica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Vários parâmetros foram testados a fim de otimizar a reação. A partir dos protocolos descritos por Carraro et al. (2008), Cooper e Subbarao (2000) e Poddar (2002)

foram realizadas reações de RT-PCR com variações nas concentrações dos componentes a fim de se obter o melhor rendimento da reação.

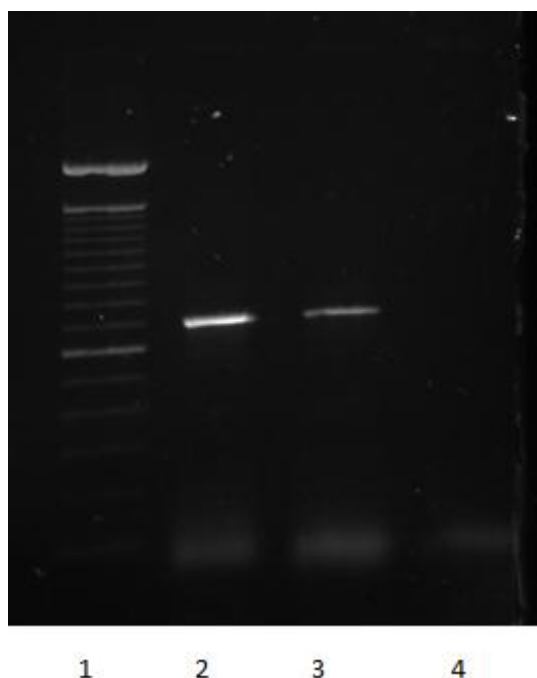
As variações nas concentrações testadas para as enzimas foram 0,25U, 0,5U, 1U, 1,5U e 2U para a enzima *Taq* DNA polimerase. Também foram realizadas curvas de concentração do cloreto de magnésio, dNTPs e primers da reação. Para o $MgCl_2$, as concentrações variaram em 1,5mM, 2mM, 2,5mM, 3mM e 3,5mM; para os dNTPs as variações foram de 0,25mM, 0,5mM, 0,75mM, 1mM e 1,25mM; e para os primers de 0,25 μ M, 0,5 μ M, 0,75 μ M, 1 μ M e 1,25 μ M. Além das concentrações foram realizadas curvas na temperatura e tempos para a anelamento dos primers, como descritos na tabela 9.

Tabela 10: Temperaturas e tempos de anelamento do primers testados na reação de amplificação do influenza A e influenza B.

Reação	Temperaturas testadas	Tempo (segundos)
Influenza A	51°C, 54°C, 56,5°C, 58°C, 61°C	20; 30; 40; 60
Influenza B	58°C, 61°C, 63,5°C, 66°C, 69°C	20; 30; 40; 60

Todas as etapas de otimização das reações foram avaliadas levando em consideração a intensidade do brilho da banda esperada, sem o aparecimento de bandas inespecíficas, no gel de eletroforese. Outro parâmetro considerado na otimização da reação foi o limite da capacidade de detecção dos ensaios de amplificação. A fim de avaliar o limite de detecção da reação de RT-PCR, foram realizadas diluições seriadas nas ordem de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} dos controles positivos. Todas as variações descritas na otimização das diferentes etapas das reações foram também avaliadas quanto a capacidade de detecção das diluições controles, sendo que a reação mostrou-se positiva com a diluição de até 10^{-2} .

Figura 10: Amplificação de cepas controles de Influenza A (698pb) em gel de agarose 1,2%.



1- padrão de peso molecular de 100pb (Invitrogen), 2- amostra cepa controle influenza A (H1N2), 3- amostra cepa controle influenza A (H3N2), 4- controle negativo.

4.8 Padronização do Ensaio de Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) utilizando reagente PCR SuperMix®

Para a otimização da técnica, utilizou um mix de reagentes prontos chamado PCR SuperMix®, parâmetros foram avaliados a fim de melhorar os resultados das amostras.

A partir do protocolo descrito por (STOCKTON et al., 1998) foram realizadas reações de RT-PCR com a fim de se obter o melhor rendimento da reação.

Figura 9: Resultado da amplificação pela RT-PCR da cepa controle de Influenza utilizando PCR SuperMix®, visualizado em gel de agarose a 1,2%



Linha 1- Marcador de peso molecular de 100pb (Invitrogen);
2- Controle negativo (água de grau molecular); linha 3- Cepa controle de Influenza B de 108pb; linha 4- Amostra positiva para o Influenza B de 108pb

O mesmo parâmetro realizado com os reagentes do PCR foi feito para o influenza A e o influenza B com o Supermix, obtendo apenas resultados positivos para o influenza B em ambas reações. Mostrando assim bom êxito, não havendo diferença na escolha dos reagentes para realizar a PCR.

4.9 Aplicação da Metodologia RT-PCR nas amostras incluídas no estudo para detecção de Influenza A e B

A metodologia RT-PCR utilizando o reagente PCR SuperMix®, devidamente padronizada, foi aplicada nas 144 amostras incluídas no presente estudo, resultando numa detecção de três amostras positivas para o Influenza B. Visto que estes três pacientes apresentaram os sintomas de febre alta, coriza, dores no corpo, e dessas apesar de estarem na faixa etária de adultos jovens, apresentaram comorbidades, gravidez, asmático e hipertenso, o que se enquadra no grupo de risco susceptível a doenças respiratórias. O qual do tratamento, dessas três, uma tomou a vacina para o influenza, e todas realizaram o tratamento com analgésicos e antigripais.

5 DISCUSSÃO

Sabe-se que um dos agentes virais causadores de doença respiratória mais frequente é o vírus Influenza, estimando-se que cerca de 5% a 20% da população seja infectada anualmente (OXFORD, 1998). O presente estudo foi realizado com pacientes de todas as idades atendidos num serviço de saúde pública primária. Assim, foram incluídos pacientes não hospitalizados com idade média de 35,17 anos e a mediana de 31 anos. Não foi encontrado na literatura estudos investigando esta etiologia em adultos jovens na região centro-oeste do Paraná. Dos estudos encontrados em literatura, relataram apenas pacientes hospitalizados e pacientes idosos, o qual já se encontra na faixa de risco de doenças respiratórias.

Em relação à inclusão de pacientes no estudo pode-se observar, através da figura 5 apresentada nos resultados, que os meses nos quais houve um maior número de amostras coletadas foi de abril a setembro nos dois anos avaliados. Estudos mostram que nas regiões tropicais, as epidemias pelo Influenza iniciam no outono e vão até o inverno. No Brasil, o Influenza predomina na estação de inverno, particularmente nos meses de junho, julho e agosto de cada ano (MONTA, 2002). Os vírus da influenza A e B são responsáveis por epidemias de doenças respiratórias que ocorrem em quase todos os invernos, com duração de quatro a seis semanas e, frequentemente, associadas com o aumento das taxas de hospitalização e morte (CHAKRAVERTY et al., 1986). Dessa maneira, esse estudo ocorreu nos meses de maior circulação de Influenza, no entanto durante o inverno houve dificuldade nas coletas de amostras respiratórias, devido ao fato do rigoroso inverno na cidade de Guarapuava-PR, as pessoas muitas vezes não vão até os atendimentos de saúde pública devido a uma infecção respiratória aguda. Visto que as três amostras positivas para o influenza B foi no período do início do inverno, é importante comentarmos que no Brasil, país com grande diversidade climática, mesmo na vigência de períodos epidêmicos, somente 20% a 50% dos casos de síndrome gripal são laboratorialmente confirmados. Muitos outros vírus respiratórios circulam, sendo difícil diferenciar clinicamente qual vírus está infectando os pacientes (WATANABE, 2006).

Atualmente, o vírus influenza H1N1 apresenta padrão sazonal, ou seja, mostra impacto variável em regiões diferentes, muitas vezes subdetectado em relação aos demais vírus influenza circulantes, como A H3N2 e influenza B. O padrão patogênico é semelhante, apesar de algumas mutações já terem sido detectadas sem alterações no impacto clínico até o momento. Apesar da aparente estabilidade, esse vírus é resultante de rearranjos genéticos e é extremamente transmissível, inclusive em outras espécies animais, sendo fundamental a vigilância clínica e laboratorial (FORREST, 2010).

O tempo de início dos sintomas respiratórios apresentados pelos pacientes incluídos no estudo teve como média 6,46 dias e a mediana de 4 dias, o que caracteriza o curto tempo de início dos sintomas desse estudo uma infecção aguda (FREITAS et al., 2011). Com base nos resultados obtidos na figura 6 do presente estudo, pode-se notar que todos os pacientes apresentaram algum sintoma. Sendo que os mais freqüentes foram a coriza com 138 (95,83%) e tosse com 107 (74,31%). Esses resultados estão de acordo com os estudos de BONFIM et al., 2011 mostrando que os sintomas clínicos predominantes na infecção respiratória de seu estudo foram coriza com (93,2%) e tosse com (58,2%) dos pacientes e PECCHINI et al, 2008 também encontraram como sintomas mais comuns tosse (92,3%) e coriza (64,7%) em pacientes no seu estudo. Mas, de acordo com as Normatizações do Ministério da Saúde (Boletim Epidemiológico, 2012), a presença de febre acompanhada de manifestações respiratórias e sintomas sistêmicos como dores musculares calafrios ou fadiga auxilia muito na distinção da influenza de outras infecções respiratórias como o resfriado comum, porém não são suficientemente específicos para se realizar um diagnóstico totalmente seguro sem confirmação laboratorial.

De acordo com Rodrigues (2002) e o MS (Guia de Vigilância Epidemiológica, 2009) para um diagnóstico baseado na definição clínica de síndrome gripal os principais sintomas são a febre e a tosse, apresentando congestão e secreção nasal, sendo frequente também o calafrio, cefaleia, dor de garganta, mialgia e fadiga. A febre normalmente varia entre 38 a 40°C com duração de 1 a 3 dias e pico nas primeiras 24 horas. Também são observados em menor frequência náuseas, dores abdominais e diarreia. A nossa população de estudo apresentou apenas sintomas moderados, com apenas

34% dos pacientes relatando febre e 31% relatando febre e tosse, que seriam os correspondentes ao quadro clássico de síndrome gripal. Contudo, Kabra (2004) no seu estudo sobre infecções respiratórias chegou à conclusão que através somente de sintomas clínicos é difícil diferenciar infecções agudas do trato respiratório de etiologia viral em comparação com não viral, sendo necessária a aplicação de testes laboratoriais.

Em adultos e crianças saudáveis, o período de duração da doença varia de uma a duas semanas e as consequências da mesma são geralmente moderadas. Por outro lado, o impacto em idosos ou indivíduos portadores de doenças crônicas pode ser mais grave, podendo haver uma descompensação de agravos de saúde pré-existentes, com muitas vezes a necessidade de hospitalização (JANSEN, 2007). Pacientes que apresentam alguma comorbidade estão mais susceptível à infecções respiratórias e, conseqüentemente, ao seu agravamento devido as alterações no sistema imunológico. Devendo, assim, levar em conta na análise integral do risco de maior gravidade e determinação do tratamento adequado. São grupos de maior risco para infecção respiratória pelo vírus influenza em especial para o pandêmico A/H1N1/09, gestantes, crianças com menos de dois anos, idosos (mais de 60 anos), pacientes com imunossupressão (câncer, AIDS, transplantados) e indivíduos com doenças crônicas (pneumopatias, cardiopatias, doenças hematológicas, doenças renais, doenças metabólicas e obesidade mórbida), fumantes, asmáticos (VERRASTRO, 2009). Quanto as comorbidades apresentadas pelos pacientes incluídos no estudo, demonstrado na tabela 7, a maioria (85/144, 59,03%) não apresentaram nenhuma comorbidade, visto que a grande maioria dos participantes são adultos jovens. Segundo o estudo (ZASLAVSKY & GUS, 2002) atualmente, as comorbidades são uma importante preocupação principalmente em idosos, pois este mesmo mostra que adultos jovens não apresentam comorbidades, assim não estão imunodeprimidos a doenças, o que justifica nosso estudo apresentarem poucas amostras positivas de influenza.

Dentre as comorbidades questionadas no estudo, a que apresentou maior relato pelos pacientes inclusos no estudo foi a hipertensão com 25 (17,35%) pacientes, nesse estudo a hipertensão atingiu adultos com idade acima de 33 anos, sendo a media de idade entre eles 55,92 anos. Já o número

total de pacientes diabéticos foi de 14 (9,71%), exceto um paciente com 15 anos de idade, todos os outros pacientes diabéticos 13 (9,02%) apresentavam idade superior a 41 anos, sendo que a média da idade desses pacientes foi de 59,84 anos de idade. Conforme o Ministério da Saúde, a Hipertensão Arterial (HA) e o Diabetes Mellitus (DM) são fatores de risco para as doenças respiratórias, doenças cardiovasculares, destacando-se como agravo em saúde pública e sendo causadoras de acidente vascular encefálico e infarto agudo do miocárdio na faixa etária de 30 a 69 anos (ARAÚJO et al., 2007).

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) atualmente é um dos principais motivos de consultas médicas e prescrições farmacológicas no mundo. Sua alta prevalência, aproximadamente 25% da população mundial e 17 milhões no Brasil no ano de 2009, é explicada pelo aumento progressivo da detecção de HAS, decorrente da ênfase na atenção primária à prevenção das doenças cardiovasculares que representam à primeira causa de mortalidade no país (OPAS, 2003). Em seguida foram os pacientes fumantes com 18 (12,49%) pacientes participantes do estudo, e a média da idade dos pacientes tabagistas foi de 48,27 anos. O tabagismo atua negativamente sobre as funções pulmonares, e é responsável por aumentar o risco das doenças pulmonares no adulto, sobretudo no idoso, que já sofre com as alterações fisiológicas decorrentes da idade. O fumo leva a uma irritação das vias aéreas que aos poucos evolui para uma alteração completa e irreversível da arquitetura pulmonar, podendo evoluir para uma insuficiência respiratória. As infecções respiratórias agudas causadas por vírus merecem destaque, já que podem ser um fator que leva à pneumonia (GOULART et al., 2010). Já a saúde infantil pode ser prejudicada pela fumaça domiciliar do tabaco, que é o mais comum poluidor do ar doméstico, podendo variar sua concentração de acordo com o número de fumantes do domicílio e do número de cigarros fumados dentro de casa. Apesar da evidência de que o fumo passivo aumenta a incidência das infecções respiratórias e de já terem sido criadas leis (Lei n. 9.294 de 1996) proibindo o fumo em alguns locais públicos, são elevadas as taxas de exposição de crianças ao tabagismo passivo no Brasil (SILVA et al., 2006).

Dentre os pacientes abordados no estudo, foram descritos 4 (2,78%) asmáticos, com idade média entre eles de 27,75 anos. Esses pacientes são considerados adultos jovens, fazendo parte do grupo de risco nas infecções

respiratórias agudas e estão na faixa etária do principal grupo em questão nesse estudo. As exacerbações da asma estão associadas a fatores precipitantes de diversas naturezas. A exposição aos alérgenos inalatórios, principalmente ao mofo, pólen e ácaro da poeira domiciliar; outros fatores precipitantes importantes são a exposição ao frio, uso de drogas, poluição atmosférica e mudanças climáticas. Além disto, as infecções do trato respiratório também têm sido associadas com as crises asmáticas. Alguns estudos mostram que em crianças, a infecção viral aumenta a reatividade das vias aéreas e é responsável por 26% a 42% dos episódios de asma aguda. Em adultos, o papel da infecção viral como causa da exacerbação da asma ainda não está muito bem definida, em estudos recentes, a frequência da identificação de vírus respiratório associado à crise asmática variou de 0% a 44% (ROCHA et al., 2005).

Nos asmáticos, a infecção viral ocasiona um desequilíbrio na homeostase imunológica do sistema respiratório. Vários mecanismos relacionados à infecção viral e à inflamação alérgica, bem como o seu papel no desencadeamento da asma aguda, têm sido propostos, entre eles a deficiência na função da barreira epitelial causada pelos vírus, que tem sido apontada como fator predisponente. Outro fator que tem sido avaliado é a produção de muco como mecanismo de defesa das vias aéreas, tendo sido demonstrado em estudos experimentais que a inflamação alérgica e a infecção viral atuam sinergicamente aumentando a sua produção, o que pode levar à obstrução das vias aéreas em asmáticos (COSTA et al., 2014). Estudos usando a técnica de diagnóstico de reação em cadeia da polimerase têm elevado a frequência de achados de infecções virais em adultos com exacerbação da asma (ROCHA et al., 2005).

O total de pacientes com doenças metabólicas foi de 10 (6,94%). E a média de idade foi de 49,30 anos entre os pacientes participantes do estudo; já os pacientes com cardiopatias foram 5 (3,46%), e a média de idade deles foi de 58,60 anos. Essas doenças são fatores de agravamento para doença respiratória (MARTINS et al., 2011).

O número total de pacientes gestantes foram apenas 3 (2,08%), estas estão no principal grupo analisado pelo estudo, devido a sua faixa etária, média da idade delas é 32,33 anos. No que diz respeito às gestantes, destaca-se que,

durante a gravidez, o corpo da mulher passa por diversas alterações imunológicas, metabólicas, endócrinas e vasculares, essas alterações ocorrem para manter o sistema imunológico materno tolerante aos antígenos paternos de histocompatibilidade maior expressos pelo feto, tornando, assim, a gestação uma estimulação do sistema imunológico, em geral, as mulheres grávidas são grupo de risco para qualquer infecção, até mesmo as respiratórias, porque têm imunidade mais baixa (PEREIRA et al., 2013).

Sobre as terapias farmacológicas utilizadas pelos pacientes inclusos no presente estudo para tratar sintomas respiratórios, pode-se perceber com bases nos resultados apresentados, que a maioria dos participantes 98 (68,06%) utilizou alguma terapia farmacológica para alívio dos sintomas, sendo que dentre estas terapias as mais frequentes foram os analgésicos. A utilização das terapias farmacológicas podem ser observadas através da tabela 9. Considerando somente os pacientes medicados desse estudo, o número de pacientes que fez o uso de analgésicos para sintoma de infecção respiratória aguda foi de 28,57% e o número de pacientes que fizeram o uso de analgésicos associados a outros medicamentos foi de 19,38%, totalizando então o uso de analgésico em 47,95% dos pacientes. Concordando com o estudo de (BRICKS & LEONE, 1996) que dentre os pacientes tratados, fármacos com ação no aparelho respiratório, analgésicos sem associações de outras terapias foram utilizados por 27,8% das crianças.

A associação de terapias farmacológicas com analgésicos onde houve mais relatos pelos pacientes nesse estudo foi com anti-inflamatórios em 10 (6,94%) dos casos, levando-se em consideração todos os pacientes.

O segundo grupo de terapia farmacológica mais utilizada pelos pacientes neste estudo foram os anti-inflamatórios não-esteróides (AINES) com o número de 10 (6,94%) pacientes e anti-inflamatório com associações 21 (14,77%) pacientes, totalizando em 31 (21,71%) dos pacientes. Apresentando resultado semelhante ao estudo de BERQUÓ et al., 2004 no qual 396 pessoas referiram ter tratado uma infecção respiratória, fizeram uso de 492 medicamentos, uma média de 1,2 por pessoa, entre esses medicamentos os anti-inflamatórios não-esteróides foram as drogas mais utilizadas 13,2% de todas as drogas do estudo (BERQUÓ et al., 2004). A ampla utilização de anti-inflamatórios não-esteróides nas doenças atribui-se à sua ação, inibindo a

síntese de prostaglandinas e propiciando alívio dos principais sintomas associados e comuns às infecções respiratórias, cefaléia, mal estar, mialgia e tosse (BERQUÓ et al., 2004). Os quais foram sintomas bastante comuns relatados pelos pacientes nesse estudo, considerados sintomas gerais, não específicos somente do trato respiratório, como a cefaléia com 93 (64,58%) pacientes, mialgia em 73 (50,69%) e tosse com 107 (74,31%).

O número total de pacientes que fizeram o uso somente de antigripais e antigripais com associações foi de 28 (18,44%) pacientes. Os antigripais combinam várias substâncias ativas. Em geral, podem ser de venda livre (ANVISA, 2003). Embora não existam estudos comprovando, sua recomendação é questionável, por varias razões, como vários princípios ativos associados, tornando o risco de efeitos adversos maior, podem incluir alguma substância contra-indicada para o paciente, correndo o risco de tomá-la sem perceber, possibilidade de sobredosagem, tomar outro medicamento com o mesmo princípio ativo contido no antigripal e a dose de certas substâncias ser inferior à recomendada.

O uso do antibiótico neste estudo foi relatado em 5 (3,47%) casos e com associação a outros medicamentos 8 (5,55%) dos casos, num total de 13 (9,02%) de pacientes fizeram o uso de antibióticos. Deve-se levar em consideração que os antibióticos devem ter indicação médica e são comprados somente mediante receita média, no entanto nesse estudo não foi questionado ao paciente incluso se a indicação do antibiótico foi realizada mediante algum exame laboratorial que comprovasse a real existência de bactérias. Alguns autores apontam maiores indicações de antibióticos quando comparado a esse estudo, segundo BENGUIGUI, 2002 observou-se que a proporção de casos de IRA tratados com antibióticos foi de 40% ou mais em crianças com menos de um ano de idade e de 60% no grupo de um a quatro anos, de acordo com as classificações ou os diagnósticos desses casos estimou-se que em ambos os grupos etários não mais de 20% deveria ter recebido tratamento com antibióticos. O uso abusivo de antibióticos para o tratamento de IRA de etiologia viral é bastante comum, isto se deve a uma multiplicidade de fatores, dentre os quais estão às dificuldades para diferenciar clinicamente infecções de etiologia viral das bacterianas, a falsa crença de que o uso profilático de antibióticos pode evitar a ocorrência de complicações, a pressão dos familiares

pela prescrição de antibióticos, expectativas dos pacientes os quais associam infecção à necessidade de uso de antimicrobianos, o desconhecimento sobre os possíveis eventos adversos associados ao uso inadequado de antibióticos, incluindo o impacto sobre o aumento da resistência bacteriana (BRICKS, 2003). Além de aumentar o custo dos tratamentos, tem impacto sobre a microbiota dos indivíduos que os utilizam, favorecendo a emergência de cepas resistentes às drogas mais utilizadas (BERQUÓ et al., 2004). Esse fenômeno requer a continuada síntese de novos antibióticos que possam vencer a resistência apresentada pelas bactérias a antibióticos que antes eram eficazes para seu controle (BENGUIGUI, 2002).

Os medicamentos antivirais foram utilizados por apenas 1 paciente, e este associado com analgésico, anti-inflamatório, antigripal e antibiótico, o emprego do antiviral foi em paciente gestante e não vacinada. Visto que no estudo haviam 3 gestantes e as outras duas já haviam tomado a vacina para o vírus da gripe H1N1, H3N2 e influenza B. Uma delas utilizou apenas analgésico para o tratamento e a outra não fez o uso de nenhuma medicação. A infecção pelos vírus da influenza sazonal ou da influenza pandêmica causa um efeito deletério maior nas mulheres grávidas do que na população geral, incluindo um possível maior risco de óbito, esse efeito deletério poderia ser explicado por uma alteração do sistema imune, por hemodiluição ou outros fatores que ocorrem na gestação, destacando-se a importância da vacina em gestantes (SARACENI et al., 2010). Os fatores que tornam as mulheres grávidas mais suscetíveis a alterações fisiológicas próprias da gestação ocorrem no sistema cardiovascular, imunológico e respiratório, além disso, o terceiro trimestre da gestação é caracterizado pela compressão das estruturas viscerais do útero (o que pode restringir a função respiratória) e hipervolemia, o que diminui a capacidade de adaptação da hemodinâmica em caso de sepse (LENZI et al., 2012). Baseado nestas modificações causadas pela gravidez, o Centro de Controle de Doença dos EUA (CDC) passou a recomendar maior atenção dos serviços de saúde em relação às gestantes com suspeita de Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 não vacinadas, a terapia com antiviral (oseltamivir) nas primeiras 48 horas após o início dos sintomas. Estas recomendações têm como objetivo minimizar as consequências da gripe neste grupo de risco (SARACENI et al., 2010).

Os antialérgicos foram utilizados por 4 (2,78%) dos pacientes e com associação de outros medicamentos 4 (2,78%), totalizando 8 (5,55%) de pacientes usando antialérgicos. Com a chegada do inverno, existe um maior número de casos dos problemas respiratórios. Os sintomas de rinite alérgica frequentemente são confundidos com os de infecções respiratórias, na rinite alérgica ocorrem sintomas como espirros, congestão e corrimento nasal (ROXO JR. et al., 2009). Devido aos sintomas nasais, alguns pacientes participantes desse estudo relataram aos pesquisadores dificuldades em diferenciar crises de rinite alérgica com infecção respiratória aguda de etiologia viral.

Os medicamentos fitoterápicos foram utilizados por 4 (2,78%) dos pacientes e 1 (0,69%) dos pacientes utilizou com associação a outro medicamento, totalizando então 5 (3,47%) dos pacientes que utilizaram medicamentos fitoterápicos. Levando-se em consideração a outras terapias farmacológicas os medicamentos fitoterápicos foram pouco utilizados pelos pacientes.

Nesse estudo devemos levar em consideração a automedicação, pois sabe-se que dentre as terapias farmacológicas apresentadas, a medicação a qual necessita de receita médica para a compra é o antibiótico, sendo assim não sabemos de que maneira os pacientes participantes do estudo decidiram pelos seus respectivos tratamentos em relação a outras terapias. No Brasil, pelo menos cerca de 35% dos medicamentos são adquiridos por automedicação (AQUINO et al., 2010).

De acordo com Paulo e Zanine, "a automedicação é um procedimento caracterizado pela iniciativa de um doente, ou de seu responsável, em obter ou produzir e utilizar um produto que acredita lhe trará benefícios no tratamento de doenças ou alívio de sintomas". A automedicação inadequada, tal como a prescrição errônea, pode ter como consequência efeitos indesejáveis, enfermidades iatrogênicas e mascaramento de doenças evolutivas, representando, portanto, problema a ser prevenido, é evidente que o risco dessa prática está correlacionado com o grau de instrução e informação dos usuários sobre medicamentos, bem como com a acessibilidade dos mesmos ao sistema de saúde. Segundo o estudo de ARRAIS et al., 1997 a escolha de medicamentos é baseada principalmente na recomendação de pessoas leigas (51,0%), sendo também relevante a influência de prescrições anteriores

(40,0%). Com relação ao segundo aspecto, é possível que a última visita ao médico 36,0% durante o período da pesquisa tenha influenciado sobremaneira o perfil dos medicamentos escolhidos (ARRAIS et al., 1997).

A etiologia viral da gripe torna injustificável a presença de antibióticos para o tratamento de doenças respiratórias, pois com o uso indevido dessas substâncias ocorre indução da resistência bacteriana (MASSUNARI, 2004).

As associações medicamentosas irracionais promovem problemas como interações medicamentosas, reações adversas imprevisíveis, ineficácia da maioria dos componentes destes medicamentos (HOEFLER, 1999). Muitos destes pacientes que resolvem automedicar-se para aliviar os sintomas da gripe já apresentam alguma outra enfermidade crônica, e faz uso sem saber que pode levar a severas complicações.

Porém, segundo a Resolução RDC nº40, de 26 de fevereiro de 2003, são aceitas associações para o tratamento sintomático da gripe contendo analgésicos/ anti-inflamatórios, descongestionantes sistêmicos e anti-histamínicos (STORMS, 2012).

A OMS estima que as drogas utilizadas em crianças tem pouco ou nenhum valor terapêutico, o que implica em enorme desperdício de recursos e a exposição a estes fármacos as torna mais vulneráveis aos efeitos adversos dos medicamentos e uma possível intoxicação medicamentosa (BRICKS, 1995).

Quanto à imunização prévia desses pacientes, contra o vírus Influenza H1N1, H3N2 e influenza B, 46 pacientes dos 144 foram vacinados representando 32%, um número relativamente baixo visto que justifica pelo fato da faixa etária do nosso estudo se encaixar em adultos jovens, isto esta demonstrado na figura 8. Devido ao fato de que se as coberturas vacinais contra a influenza estão adequadas uma hipótese plausível é o aumento da circulação de outros vírus de tropismo respiratório. Entre os mais frequentemente associados com infecções pulmonares e suas complicações está o vírus sincicial respiratório (DONALISIO et al., 2006), visto que o RSV apresenta sazonalidade semelhante ao vírus influenza (CINTRA & REY, 2006). No Brasil, o sistema de vigilância sentinela de quadros respiratórios indicou, além do vírus da influenza A e B (14,7%), a circulação de RSV (26,7%),

adenovírus (17%) e parainfluenza (16,3%), entre 2000 e 2003 (DONALISIO et al., 2006).

Na campanha nacional de vacinação contra Influenza os grupos prioritários a serem vacinados são indivíduos com 60 anos ou mais de idade, serão vacinados os trabalhadores de saúde, os povos indígenas, as crianças na faixa etária de 6 meses a menores de 5 anos de idade (4 anos, 11 meses e 29 dias), as gestantes, as puérperas (até 45 dias após o parto), os grupos portadores de doenças crônicas não transmissíveis e outras condições clínicas especiais (CAMP. NAC. VACINAÇÃO INFLUENZA, 2014). Levando-se em consideração que idade média dos pacientes incluídos nesse estudo foi de 35,17 anos e a mediana de 31 anos, portanto podem ser considerados adultos jovens e que 85 (59,03%) dos pacientes participantes do estudo não apresentavam nenhuma comorbidade questionada no estudo. Desse modo pode-se dizer que a quantidade de pacientes vacinados 46 (31,94%) é baixa visto que o grupo etário predominante no estudo não é considerado grupo prioritário para vacinação contra os 3 tipos de vírus influenza.

Alguns estudos demonstram que a vacinação pode reduzir entre 32% a 45% o número de hospitalizações por pneumonias, e de 39% a 75% a mortalidade global. Entre os idosos, pode reduzir o risco de pneumonia em aproximadamente 60%, e o risco de complicação de 50% (MOURA, 2003).

Em relação às metodologias moleculares, essas podem ser empregadas para detecção de Influenza com alta sensibilidade e especificidade. Nesse estudo utilizou a técnica de RT-PCR que se tornou amplamente utilizada para tal finalidade através da sua capacidade de detectar pequenas quantidades de cópias de material genético, além de detectar partículas armazenadas por longo período de tempo. Existem estudos que demonstram uma maior capacidade de detecção por RT-PCR para Influenza em amostras de secreção nasal.

Há uma clara tendência para a utilização de técnicas que permitem o diagnóstico precoce da infecção pelo Influenza, o diagnóstico precoce é vantajoso porque permite a implementação de medidas para limitar a propagação do vírus como em hospitais ou casas de repouso, e a implementação precoce da terapia antiviral.

No Brasil e em outros países, os programas de vigilância do vírus respiratórios usam técnicas de diagnóstico convencionais, como o IF. Uma grande proporção de amostras biológicas permanecem negativos, mesmo com evidência clínica de infecção respiratória. Uma técnica molecular tal como PCR em tempo real pode ser uma ferramenta importante, aumentando a capacidade de detecção de um grande número de agentes patogênicos respiratórios. Além disso, este tipo de técnica pode contribuir para a correta indicação de medicamentos antivirais, pode evitar o uso desnecessário de antibióticos e pode promover a adoção de medidas de controle hospitalar apropriados.

Os resultados deste estudo mostram que a aplicação de ensaios de PCR em um formato multiplex em tempo real para patógenos respiratórios aumenta consideravelmente a taxa de detecção de patógenos quando comparado aos métodos convencionais, destacando o papel do vírus da gripe em casos de IRA em pacientes de todas as idades, em além de relatar a circulação de vírus respiratórios recentemente descrita Influenza A H1N1, H3N2 e influenza B.

Imunofluorescência (IF), por outro lado, é largamente utilizado para detectar Influenza em células epiteliais da nasofaringe porque é mais rápido e menos trabalhoso que o isolamento, no entanto, a técnica IF requer uma amostra rica em células, a perícia na manipulação de um microscópio de imunofluorescência e é menos sensível do que a RT-PCR. A escolha de uma técnica é de extrema importância para o diagnóstico rápido e sensível de Influenza (REIS et al., 2008).

No presente estudo, RT-PCR foi a metodologia escolhida para garantir uma detecção viral com alta sensibilidade e especificidade. A RT-PCR funciona muito bem com a maioria dos alvos de RNA, mas geralmente são necessários ajustes nos parâmetros da reação, a fim de melhorar a especificidade e aumentar o rendimento, segundo (CONNEL, 2002) não existe um único protocolo que seja adequado para todas as situações, incluindo laboratório, reagentes e recursos humanos, assim para cada nova experiência é necessário realizar a otimização da reação. A otimização da metodologia RT-PCR realizada no estudo, foi fundamentada em protocolos previamente descritos que visou aumentar o rendimento da reação, com a finalidade de garantir o maior limite de detecção em cada reação, realizada através de

alterações nas concentrações de $MgCl_2$, enzimas, temperaturas de anelamento dos primers, reagente PCR SuperMix® e interpretação dos resultados obtidos através da visualização em eletroforese dos produtos da amplificação sem o aparecimento de bandas inespecíficas (CONNEL, 2002).

Pequenas variações em qualquer uma das muitas variáveis da reação de RT-PCR podem levar a um efeito pronunciado sobre o perfil do produto da amplificação (CONNEL, 2002). Em relação à padronização do ensaio de Transcrição Reversa e Reação em Cadeia da Polimerase (RT-PCR) foi tentado ao máximo eliminar a possibilidade de ocorrer resultados falsos positivos e falsos negativos durante a otimização da técnica molecular, sempre fazendo o uso de controles positivos e negativos e executando os ensaios através das condutas de boas práticas laboratoriais.

Levando-se em consideração que um dos objetivos do trabalho era a padronização da técnica PCR, houve a padronização dos componentes da reação separadamente e a padronização da técnica utilizando o PCR SuperMix® de reagentes, e pôde-se observar que as duas formas são sensíveis e específicas frente ao controle positivo e negativo de Influenza, sendo assim optou-se pela técnica de PCR utilizando o PCR SuperMix® na tabela 5 de reagentes devido a otimização de tempo e praticidade, visto que foram várias amostras analisadas. Em todos os procedimentos da reação RT-PCR aplicada nas amostras inclusas no estudo foi utilizado um controle positivo e um negativo, para confirmação da técnica na avaliação das amostras analisadas.

Segundo a figura 9 podemos observar que não houve detecção de Influenza A nas amostras respiratórias coletadas no presente estudo, através da aplicação da metodologia RT-PCR devidamente padronizada. Diante desse resultado devemos levar em consideração que este foi um estudo realizado na comunidade em Guarapuava- PR.

Estudos que visem acompanhar o perfil das doenças respiratórias na comunidade são de extrema importância para se detectar o nível de ocorrência, características da doença em diferentes manifestações clínicas, desde quadros leves até suas complicações, além de avaliar a sazonalidade local.

No entanto a grande maioria dos estudos com o Influenza são realizados em ambientes hospitalares e poucos estudos avaliam a circulação desse

agente etiológico na comunidade. Assim, estudos em âmbito hospitalar frequentemente relatam uma incidência maior de Influenza do que os estudos em comunidade, pois o vírus acomete preferencialmente crianças e idosos, sendo que nelas a infecção se desenvolve de forma mais grave levando a hospitalização (D'ELIA et al., 2005).

A ausência de positividade nas amostras investigadas pode representar uma limitação do estudo relacionada com a inclusão dos pacientes, que não foi sistemática e ocorreu durante um curto período de tempo. Devido a possibilidade de variação sazonal na circulação de Influenza seriam recomendados estudos por período mínimo de 3 anos para demonstrarem uma sazonalidade viral mais fidedigna (LEVY et al., 2009). Outro fator que pode justificar a ausência de amostras positivas é ao fato do nosso estudo estar na faixa etária de adultos jovens, o qual não se enquadra na faixa de risco e até mesmo devido a infecção aguda respiratória ser uma doença auto-limitada, o que leva as pessoas não procurarem as assistências básicas de saúde, dificultando um possível diagnóstico positivo.

Outro fator que justifica o nosso trabalho é os diversos contra-tempos surgidos no percurso da realização deste trabalho, como a falta de controles positivos, de reagentes, armazenamento das amostras.

Este foi o primeiro estudo realizado em atendimento de serviço público de Saúde de casos com doenças respiratórias agudas na cidade de Guarapuava- PR, em que foi avaliada a etiologia de Influenza, que poderá servir como base para estabelecer estratégias de diagnóstico, prevenção da doença e também para medidas de controle. Porém é necessário que continue estudos sobre esse vírus, com um maior número de amostras e por um período mais prolongado de tempo das coletas, podendo assim obter maiores informações sobre a sua etiologia e epidemiologia nessa região, demonstrando assim a determinação da verdadeira importância do Influenza nas infecções respiratórias.

Quanto ao aparecimento de três amostras positivas para o Influenza B, visto ser o patógeno menos frequente e associados a casos esporádico, pode ser justificado pela ausência de surto durante o período estudado para o Influenza A e ser explicado por se tratar de uma cepa na qual a mutação é lenta por ter o homem como seu único hospedeiro. Segundo (WHO, 1980), o

vírus Influenza A ocorre em casos de doenças respiratórias conforme for aumentando ainda mais a faixa etária. É importante ressaltar que resultados negativos não excluem a possibilidade de infecção. Nesses casos, deve-se avaliar o período da coleta em relação ao início dos sintomas, o armazenamento, o sítio anatômico da infecção no trato respiratório e o uso prévio de antivirais. Lembrando também que para a realização de PCR o exame deve ser realizado nos primeiros cinco dias de infecção, quando a carga viral é mais elevada.

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados, pode-se dizer que foi concluída a padronização e otimização da técnica de RT-PCR no laboratório de Virologia e Biologia Molecular da UNICENTRO com êxito. Houve obtenção das amostras de secreção nasal, a coleta e análise de dados dos pacientes inclusos no estudo. No entanto não foram detectados casos de infecção respiratória por Influenza A em amostras de secreção nasal coletadas de pacientes com sintomas respiratórios na cidade de Guarapuava- PR através da aplicação de metodologia PCR devidamente padronizada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLANDER, T.; TAMMI, M.T.; ERIKSSON, M.; BJERKNER, A.; TIVELJUNG-LINDELL, A.; ANDERSSON, B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. **Proc Natl Acad Sci**, v.102, p. 12891-12896, 2005.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Anvisa retira antigripais do mercado e os reclassifica como "tratamento sintomático da gripe"*. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2003/270203.htm>>. Acesso em 10 de agosto de 2014.

AQUINO, D.S.; BARROS, J.A.C.; SILVA, M.D.P. *Self-medication and health academic staff*. *Ciênc. saúde coletiva.*, v.15, n.5, p.2533-2538, 2010.

ARAÚJO, T.M.E.; F.S.; NASCIMENTO, D.J.C.; COSTA, F.S.R. *Vacina contra Influenza: conhecimentos, atitudes e práticas de idosos em Teresina*. *Rev. bras. Enferm.*, v.60, n.4, p.439-443, 2007.

ARRAIS, P.S.D.; COELHO, H.L.L.; BATISTA, M.C.D.S.; CARVALHO, M.L.; RIGHI, R.E.; ARNAU, J.M. *Perfil da automedicação no Brasil*. *Rev. Saúde Pública.*, v.31, n.1, p.71-77, 1997.

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.

ARRUDA, E.; CINTRA, O.A.L.; HAYDEN, F.G. Respiratory tract viral infections. In RL Guerrant, *Tropical infectious diseases - Principles, pathogens and practice*. **Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia**, v.1, p. 637-659, 2006.

ATSUSHI, K.; HIDEYUKI, K.; KOH-ICHI, T.; JUN-ICHIRO, S.; SEIJI, P., YAMAMOTO, U.K.; MASAO, T.; KIYOKO A.; MASASHI, S.; MINORI, O.; KAORU, G.; ATSUHI, H.; TSUTOMU, K.; NOBUHIRO, I. Associations between Co-Detected Respiratory Viruses in Children with Acute Respiratory Infections. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v.67, p.469–475, 2014.

AULT, A. Shifting Tactics in the Battle Against Influenza. **Science**, v.303, n.5662, p. 1280, 2004.

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.

BENGUIGUI, Y. As infecções respiratórias agudas na infância como problema de saúde pública. *Bol. Pneumol. Sanit.*, v.10, n.1, p.13-22, 2002.

BERQUÓ, L.S.; BARROS, A.J.D.; LIMA, R.C.; BERTOLDI, A.D. Utilização de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias na comunidade. *Rev. Saúde Pública.*, v.38, n.3, p.358-364, 2004.

[BECKMANN, C.](#); HIRSCH, H.H. Diagnostic performance of near-patient testing for influenza. [J Clin Virol.](#), Jun;67:43-6. doi: 10.1016/j.jcv.2015.03.024, 2015.

BEZERRA, P.G.; BRITTO, M.C.; CORREIA, J.B.; DUARTE, M.C.; FONSECA, A.M.; ROSE, K.; HOPKINS, M.J.; CUEVAS, L.E.; MCNAMARA, O.S. Viral and atypical bacterial detection in acute respiratory infection in children under five years. **PLoS ONE**, v.6, p.e18928, 2011.

BINNICKER, M.J.; ESPY, M.J.; IRISH, C.L.; VETTER, E.A. Direct Detection of Influenza A and B Viruses in Less Than 20 Minutes Using a Commercially Available RapidPCR Assay. [J Clin Microbiol.](#), Jul., v.53, n.7, p. 2353-4. doi: 10.1128/JCM.00791-15, 2015.

BISNO, A.L. Acute pharyngitis. **N Engl J Med**, v.344, n.3, p.205-211, 2001.

BLOOM, J.D.; GONG, L.I.; BALTIMORE, D. Permissive secondary mutations enable the evolution of influenza oseltamivir resistance. **Science**, v. 328(5983), p.1272–5. doi:10.1126/science.1187816 12, 2010.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v.44, n.14, 2013.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO- Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, v.44, n.15, 2013.

BONFIM, C.M.; NOGUEIRA, M.L.; SIMAS, P.V.M.; GARDINASSI, L.G.A.; DURIGON, E.L.; RAHAL, P.; SOUZA, F.P. *Patógenos respiratórios frequentes em casos de infecções do trato respiratório em crianças de creche*. *Jornal de Pediatria.*, v.87, n.5, p.439-444, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, **Boletim epidemiológico, Caderno especial Influenza**. Núcleo de comunicação. Ano 10:2, 2010.

BRICKS, L.F.; LEONE, E.C. *Use of medicines by children attending nursery schools*. *Rev. Saúde Pública.*, v.30, n.6, p. 527-535,1996.

BRICKS, L.F. *Judicious use of medication in children*. *J. Pediatr. (Rio J.)*, v.79, n.1, p.S107-S114, 2003.

BRYCE, J.; BOSCHI-PINTO, C.; SHIBUYA, K.; BLACK, R.E. WHO estimates of the causes of death in children. WHO Child Health Epidemiology Reference Group. **Lancet**, v.365, p.1147-1152, 2005.

CAMPANHA NACIONAL DE VACINAÇÃO CONTRA A INFLUENZA- *informe técnico*, Brasília, 2014. Disponível em <http://www.sbim.org.br/wp-content/uploads/2014/04/Informe_Campanha_Influenza--25_03_2014.pdf>. Acesso em 01 de agosto de 2014.

CDC. **Centers for Disease Control and Prevention**. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.50, n.(RR-4): p.1-44, 2001.

Center for Disease Control. Prevention and control of Influenza recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). MMWR, 52(Nº RR-08), 2003.

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.

[CHOUDHARY, M.L.](#); [ANAND, S.P.](#); [TIKHE, S.A.](#); [WALIMBE, A.M.](#); [POTDAR, V.A.](#); [CHADHA, M.S.](#); [MISHRA, A.C.](#) Comparison of the conventional multiplex RT-PCR, real time RT-PCR and Luminex xTAG® RVP fast assay for the detection of respiratory viruses. [J Med Virol.](#), Jun 22. doi: 10.1002/jmv.24299, 2015.

CINTRA, O.A.L.; Rey, L.C. *Segurança, imunogenicidade e eficácia da vacina contra o vírus influenza em crianças*. J. Pediatr. (Rio J.), v.82, n.3, p.s83-s90, 2006.

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.

CONNEL JOE O. *RT-PCR Protocols*. V.193. New Jersey: Humana Press Totowa, 2002..

COSTA, L.D.C.; COSTA, P.S.; CAMARGO, P.A.M. *Exacerbação da asma e infecção das vias aéreas: o vírus é o vilão?*. J. Pediatr. (Rio J.), v.90, n.6, p.542-55, 2014.

COX, N.J.; FUKUDA, K. Influenza. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.12, p.27-38, 1998.

COX, N.J.; SUBBARAO K. Influenza. **Lancet**, v.354, n.9186, p.1277-1282, 1999.

CUNHA, [B.A.](#) Influenza: historical aspects of epidemics and pandemics. [Infect Dis Clin North Am.](#), Mar., v.18, n.1, p.141-55, 2004.

DAVIES, W.L.; GRUNERT, R.R.; HAFF, R.F.; MCGAHEN, J.W.; NEUMAYER, E.M.; PAULSHOCK, M. Antiviral activity of 1-adamantanamine (amantadine). **Science**, v.144(3620):862–3. doi:10.1126/science.144.3620.862, 1964.

DAWOOD, F.S.; IULIANO, A.D.; REED, C.; et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: a modelling study. *Lancet Infect Dis.*, Sep; v.12, n. 9, p.655, 2012.

D'ELIA, C.; SIQUEIRA, M.M.; PORTES, S.A.; SANT'ANNA, C.C. Infecções do trato respiratório inferior pelo vírus sincicial respiratório em crianças hospitalizadas menores de um ano de idade. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.38, n.1, p.7-10, 2005

DONALISIO, M.R.; FRANCISCO, P.M.S.B.; LATORRE, M.R.D.O. *Tendência da mortalidade por doenças respiratórias em idosos antes e depois das campanhas de vacinação contra influenza no Estado de São Paulo - 1980 a 2004.* *Rev. bras. epidemiol.*, v.9, n.1, p.32-41, 2006.

FALSEY, A.R.; CUNNINGHAM, C.K.; BARKER, W.H.; KOUIDES, R.W. Respiratory Syncycial virus and Influenza A infections in the hospitalized elderly. **J Infect Dis**, v.172, p.389-94, 1995.

FIGUEIREDO, L.T.M. *Pneumonias virais: aspectos epidemiológicos, clínicos, fisiopatológicos e tratamento.* *J. bras. pneumol.*, v.35, n.9, p.899-906, 2009.

FIORE, A.E.; BRIDGES, C.B.; KATZ, J.M.; COX, N.J. Inactivated influenza vaccines. In: Plotkin S, Orenstein W, Offit P (Editors). **Vaccines**. Philadelphia, PA: **Saunders Elsevier**, p.257-293, 2013.

FORLEO-NETO, E.; HALKER, E.; SANTOS, V.J.; PAIVA, T.M.; TONIOLO-NETO, J. Influenza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p.267-274, 2003.

FORREST, L.H.; WEBSTER, R.G. Perspectives on influenza evolution and the role of research. **Animal Health Research Reviews**, v.11, n.1, p.3-18, 2010.

FREITAS, T.V.S.; ONO, G.; CORRÊA, L.; GOMES, P.S.; GALANTEI, N.Z.; SILVAI, H.T.; CAMARGO, F.A.; PESTANAI, J.O.A.M. *Manifestações clínicas e evolução da infecção pelo vírus da influenza A (H1N1) em receptores de transplante renal*. J. Bras. Nefrol., v.33, n.2, p.136-141, 2011.

FORREST, L.H.; WEBSTER, R.G. Perspectives on influenza evolution and the role of research. **Animal Health Research Reviews**, v.11, n.1, p.3-18, 2010.

GIRARD, M.P.; TAM, J.S.; ASSOSSOU, O.M.; KIENY, M.P. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. [Vaccine](#). Jul., v.12, n.28(31), p.4895-902. doi: 10.1016/j.vaccine, 2010.

GOULART, D.; ENGROFF, P.; ELYI, L.S.; SGNAOLIN, V.; SANTOS, E.F.; TERRAI, N.L.; CARLI, G.A. *Smoking in the elderly*. Rev. Bras. Geriatr. Gerontol., v.13, n.2, p.313-320, 2010.

HANNOUN, C.; DAB, W.; COHEN, J.M. A new influenza surveillance system in France: the Ile-de-France "GROG". 1. Principles and methodology. **European Journal of Epidemiology**, v.5, p.285-293, 1989.

HANNOUN, C. La grippe et ses virus. Paris, France: **Presses Universitaires de France**, p.60-61, 1995.

HAY, A.J.; WOLSTENHOLME, A.J.; SKEHEL, J.J.; SMITH, M.H. The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. **EMBO J.**, v.4, n.11, p.3021–4, 1985.

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

HEIKKINEN T, CHONMAITREEE T. Increasing importance of viruses in acute otitis media. **Ann Med**, v.32, n.3, p. 157-163, 2000.

IPARDES - INSTITUTO PARANAENSE DE DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO E SOCIAL. Disponível em:

<http://www.ipardes.gov.br/perfil_municipal/MontaPerfil.php?Municipio=85000&btOk=ok>.

Acessado em 10 de out. de 2014.

JAIN, N.; LODHA, R.; KABRA, S.K. Upper respiratory tract infections. **Indian J Pediatr**, v.68, n.12, p.1135-1138, 2001.

JANSEN, A.G.; SANDERS, E.A.; HOES, A.W.; VAN LONN, A.M.; HAK, E. Influenza- and respiratory syncytial virus-associated mortality and hospitalisations. **Eur Respir J**. v.34, n. 7, 2007.

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.

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.

LAMB, R.A.; KRUG, R.M. Orthomyxoviridae: Their Virus and their Replication, chapter 46, In B.N. Fields, D.M. Knipe et. al. (eds.), **Virology**. Raven Press

Ltd., New York, 2nd ed., 2001. Disponível em <http://pco.ovid.com/lrppco/index.html>.

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.

LEE, I.; BARTON TD. Viral respiratory tract infections in transplant patients: epidemiology, recognition and management. **Drugs**, v.67, n.10, p.1411-1427, 2007.

LENZI. L.; PONTAROLO, R. *Evaluation of pregnancy as a risk factor in the outcomes of influenza A (H1N1)/2009 in women of childbearing age*. Cad. Saúde Pública., v.28, n.2, p.395-399, 2012.

LEVY, K.; HUBBARD, A.E.; EISENBERG, J.N. Seasonality of rotavirus disease in the tropics: a systematic review and meta-analysis. *International Journal Epidemiology*. v.38, n.6, p.1487-1496, 2009.

LIFE TECHNOLOGIES CORPORATION ©2010. PCR SuperMix High Fidelity. Acesso em: 10. Abril, 2015. Disponível em: https://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/pcr_supermix_hifi_man.pdf.

MACKIE, P.L. The classification of viruses infecting the respiratory tract. **Paediatr Respir Ver**, v.4, n.2, p.84-90, 2003.

MARTIN, E.T.; FAIRCHOK, M.P.; STEDNICK, Z.J. Epidemiology of multiple respiratory viruses in childcare attendees. **J Infect Dis.**, v.207, p.982-9, 2013.

MARTINS, W.A.; RIBEIRO, M.D.; OLIVEIRA, L.B.; BARROS, L.S.N.; JORGE, A.C.S.M.; SANTOS, C.M.; ALMEIDA, D.P.; CABRAL, I.F.; SOUZA, R.T.; FURQUIM, T.A.B. *Vacinação contra influenza e pneumococo na insuficiência*

cardíaca - uma recomendação pouco aplicada. Arq. Bras. Cardiol., v.96, n.3, p.240-245, 2011.

MCHARDY, A.C. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A Virus. **PLoS Pathog**, v.5, n.10, p.10.1371, 2009.

MONTO, A.S. Viral respiratory infections in the community: epidemiology, agents, and interventions. **Am J Med**, v.99, n.6B, p.24S-27S, 1995.

MONTO, A.S. Epidemiology of Viral Respiratory Infections. **Am J Med**, v.112 (Suppl. I), p.4-12, 2002.

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

[MOTTA, F.C.](#); [ROSADO, A.S.](#); COUCEIRO, [J.N.](#) Standardization of denaturing gradient gel electrophoresis for mutant screening of influenza A (H3N2) virus samples. **J Virol Methods**, Mar.; v.101, n.1-2, p.105-15, 2002.

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

NEUZIL, K.M.; GRIFFIN, M.R.; SCAFFNER, W. Influenza Vaccine: Issues and Opportunities. **Infect Dis Clin North Am**, v.15, p.123-141, 2001.

NICHOLSON, K.G.; WEBSTER, R.G.; HAY, A.J.T. **Textbook of Influenza**, 1998.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Weekly Epidemiological Record**, v.75, p.281-288, 2000.

OMS, Organização Mundial da Saúde. **Weekly Epidemiological Record**, v.76, p.58-61, 2001.

OSTERHAUS, A.D. New respiratory viruses of humans. **Pediatr Infect Dis J**, v.27, p.71-74, 2008.

OXFDORD, J.S.; LAMBKIN, R. Targeting influenza virus neuraminidase – a new strategy for antiviral therapy. **Drug Discovery Today**, v.3, p.448-456, 1998.

PECCHINI, R.; BEREZIN, E.N.; FELICIO, M.; PASSOS, S.D.; SOUZA, M.C.; LIMA, L.R. Incidence and clinical characteristics of the infection by the respiratory syncytial virus in children admitted in Santa Casa de São Paulo Hospital. **Braz J Infect Dis.**, v.12, p.476-479, 2008.

PECCHINI, R. *Prevalência de vírus respiratório em crianças internadas por doença respiratória aguda*. 2008. Dissertação de Mestrado. Pós graduação na Faculdade de ciências médicas da Santa Casa de São Paulo., 2008.

PEREIRA, B.F.B.; MARTINS, M.A.S.; BARBOSA, T.L.A.; SILVA, C.S.O.; GOMES, L.M.X.G. *Reasons why pregnant women did not vaccinate against Influenza A H1N1*. Ciênc. saúde coletiva., v.18, n.6, p.1745-1752, 2013.

REIS, A.D.; FINK, M.C.D.; MACHADO, C.M.; PAZ, J.P.; OLIVEIRA, R.R.; TATENO, A.F.; MACHADO, A.F.; CARDOSO, M.R.; PANNUTI, C.S. *Comparison of direct immunofluorescence, conventional cell culture and polymerase chain reaction techniques for detecting respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates from infants*. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo., v.50, n.1, p.37-40, 2008.

RICETTO, A.G.L.; SILVA, L.H.A.; SPILKI, F.R.; MORCILLO, A.M.; ARNS, C.W.; BARACAT, E.C.E. **Genotypes and clinical data of respiratory syncytial virus and metapneumovirus in brazilian infants: a new perspective**. Braz. J. Infect Dis., v.13, n.1, p.35-39, 2009.

ROCHA, I.T.M.; MENEGOTTO, D.; HOFFMANN, C.F.; BARRETO, S.S.M.; DALCIN, P.T.R.; STRALIOTTO, S.M.; KANG, S.H.; PASIN, L.R.; FISCHER, J.; NIETO, F. *Incidência de infecção viral do trato respiratório em asma aguda atendida em sala de emergência*. J. bras. pneumol., v.31, n.5, p.382-389, 2005.

ROXO JR, P.; CARVALHO, B.T.C.; TAVARES, F.S. *Infecções de repetição: o que é importante para o pediatra*. Rev. Paul. pediatr., v.27, n.4, p.430-435, 2009.

SAMSON, M.; PIZZORNO, A.; ABED, Y.; BOIVIN, G. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. **Antiviral Res**, v. 98, n. 2, p.174–85. doi:10.1016/j.antiviral.2013.03.014 11, 2013.

SARACENI, V.; NICOLAI, C.C.A.; TOSCHI, W.D.M.; CARIDADE, M.C.; AZEVEDO, M.B.; ROCHA, P.M.M.; SILVA, R.L. *Outcomes of Pandemic Influenza (H1N1) 2009 in women of childbearing age, in the City of Rio de Janeiro*. Epidemiol. Serv. Saúde., v.19, n.4, p.339-346, 2010.

Secretaria de Vigilância em Saúde. O desafio da influenza: Epidemiologia e organização da Vigilância no Brasil. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v.4, n.1, p.1-7, 2004.

SHOPE, R.E. Swine Influenza: III. Filtration experiments and etiology. **J Exp Med.**, Jul., v. 31, n. 54(3), p.373-85, 1931.

SHORT, K.R.; KROEZE, E.J.; FOUCHIER, R.A.; KUIKEN, T. Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome. **Lancet Infect Dis**, v.14, n.1, p.57–69. doi:10.1016/S1473-3099(13)70286-X, 2014.

SILVA, R.M.V.G.; VALENTE, J.G.; SANTOS, M.G.F.L.; SICHIERI, R. *Household smoking and respiratory disease in under-five children*. Cad. Saúde Pública., v.22, n.3, p.579-586, 2006.

STIVER, G. The treatment of influenza with antiviral drugs. **CMAJ**, v.168, n.1, p. 49–56. 8, 2003.

STORMS, A.D.; GUBAREVA, L.V.; SU, S.; WHEELING, J.T.; OKOMO-ADHIAMBO, M.; PAN C.Y.. Oseltamivir-resistant pandemic (H1N1) 2009 virus infections, United States. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 2, p. 308–11. doi:10.3201/eid1802.111466, 2012.

SULLIVAN, J.S.; JACOBSON, R.M.; DOWDLE, R.W.; POLAND, G.A. **Influenza H1N1 2009**. Mayo Clinic Proceedings, v.85, n.1, p.64-76, 2010.

VAN DEN HOOGEN, B.G.; DE JONG, J.C.; GROEN, J.; KUIKEN, T.; DE GROOT, R.; FOUCHIER, R.A.; OSTERHAUS, A.D. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. **Nat Med**, v.7, p.719-724, 2001.

VAN DER HOEK, L.; PYRC, K.; JEEBINK, M.F.; VERMEULEN-OOST, W.; BERKHOUT, R.J.; WOLTHERS, K.C.; WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.; KAANDORP, J.; SPAARGAREN, J.; BERKHOUT, B. Identification of a new human coronavirus. **Nat Med**, v.10, p.368-373, 2004.

VERRASTRO, C.G.Y.; ABREU, L.Jr.; HITOMI, D.Z. Manifestations of infection by the novel influenza A (H1N1) virus at chest computed tomography. **Radiol Bras.**, n.42, p.343-348, 2009.

ZASLAVSKY, C.; GUS, I. Idoso. *Doença Cardíaca e Comorbidades*. Arq. Bras. Cardiol., v.79, n.6, p.635-639, 2002.

WATANABE, A.S.A. **Pesquisa de Vírus Respiratórios em uma População de Idosos da Cidade de Botucatu – São Paulo, Brasil**. 55 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2006.

WATHEN, M.W.; BARRO, M.; BRIGHT, R.A. Antivirals in seasonal and pandemic influenza – future perspectives. **Influenza Other Respi Viruses**, v. 7 (Suppl 1), p.76–80. doi:10.1111/irv.12049 10, 2013.

WEI, S.C.; NORWOOD, J. Diagnosis and management of respiratory tract infections for the primary care physician. **Obstet Gynecol Clin North Am**, v.28, n.2, p. 283-304, 2001.

WEBBY, R.J.; WEBSTER, R.G. Are We Ready for Pandemic Influenza? **Science**, v.302, n.5650, p.1519-1522, 2003.

WEBSTER, R.G.; GOVORKOVA, E.A. Continuing challenges in influenza. **Ann N Y Acad Sci**, v.1323, p.115–39. doi:10.1111/nyas.12462, 2014.

WOO, P.C.; LAU, S.K.; CHU, C.M.; CHAN, K.H.; TSOI, H.W.; HUANG, Y.; WONG, B.H.; POON, R.W.; CAI, J.J.; LUK, W.K.; POON, L.L.; WONG, S.S.; GUAN, Y.; PEIRIS, J.S.; YUEN, K.Y. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. **J Virol**, v.79, p. 884-895, 2005.

WEBSTER, R.G.; GOVORKOVA, E.A. Continuing challenges in influenza. **Ann N Y Acad Sci**, v.1323, p.115–39. doi:10.1111/nyas.12462, 2014.

ANEXOS

ANEXO 1:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

Você esta sendo convidado a participar de um estudo que tem por objetivo investigar o impacto clínico e epidemiológico da infecção por doenças respiratórias no município de Guarapuava, PR.

Para a sua participação, deverá autorizar que a amostra nasal já coletada para a detecção de influenza seja utilizada também para a genotipagem desse vírus e responder um questionário sobre avaliação de aspectos clínicos e demográficos da família. Se concordar em participar, garantimos sigilo das informações e o não aparecimento do seu nome. Sua participação é voluntária, o Sr (a) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. O Sr (a.) tem liberdade de participar do estudo ou desistir a qualquer momento. Nenhum dos procedimentos usados oferece riscos à sua dignidade ou saúde isto é não envolve riscos diretos ao Sr (a.). Os resultados deste estudo serão utilizados e divulgados em eventos científicos, nos quais pesquisadores se comprometem a divulgar os resultados obtidos.

Pesquisadores responsáveis: Daniele Antonelo Campos e Fernanda Carolina Pedrosa;

Email: daniantonelo@hotmail.com;

Fone: 99379743 ou 99126046 Horário: 8:00 às 11:00 e das 13:30 às 17:30.

Eu _____ declaro que estou dispondo-me a conceder esta entrevista, li o termo acima e entendi o objetivo do estudo do qual fui convidado a participar. Entendi que sou livre para interromper minha participação a qualquer momento sem justificar minha decisão e sem que esta afete meu trabalho e autorizo voluntariamente a utilização do material clínico de meu dependente _____ nas atividades da pesquisa.

Assinatura do Pesquisador

Assinatura do responsável

Guarapuava, _____, de

de 2015

ANEXO 2:**Questionário clínico e epidemiológico aplicado aos pacientes**

Número:

Local da Coleta:

Data da coleta:

Nome do paciente:

Idade:

Sexo: F () M ()

Telefone:

Quantas pessoas na residência:

crianças <5anos: SIM() NÃO()

Quantos sintomáticos:

Início dos sintomas: dias

Febre: SIM () NÃO ()

Sintomas respiratórios: Tosse ()

Coriza/Obst: ()

Dor de garganta ()

Sintomas gerais: Cefaléia () Mialgia () Calafrios ()

Doença de base:

Cardiopatia ()

Pulmonar ()

Diabetes ()

Metabólicas ()

Hipertensão ()

Tabagismo ()

Outros:

Vacina SIM () NÃO ()

Medicamentos:

Contato posterior sobre o andamento do caso:

Data:

Duração dos sintomas: dias

Febre: SIM () NÃO ()

Sintomas respiratórios: Tosse ()

Coriza/Obst: ()

Dor de garganta ()

Sintomas gerais: Cefaléia () Mialgia () Calafrios ()

Uso de medicamentos:

Internação (dias):

Ausência no trabalho por parte do cuidador (dias):

Novos sintomáticos:

Sintomáticos anteriores (melhora/piora):

Outros: