Emergência de resistência aos antivirais específicos para a gripe em Portugal

Emergence of resistance to influenza antiviral drugs in Portugal

/ V. Correia / L. A. Santos
/ H. Rebelo-de-Andrade

Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, Lisboa.

Correspondência:

Professora Doutora Helena Rebelo-de-Andrade

Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Doenças Infecciosas, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
Avenida Padre Cruz
1649-016 Lisboa

Telefone: +351 217508159
e-mail: h.rebelo.andrade@insa.min-saude.pt; andradeh@paho.org

Patrocínios:
Trabalho desenvolvido no âmbito do projecto de investigação Vigilância e monitorização da susceptibilidade aos antivirais específicos para a gripe, financiado pela Fundação Calouste Gulbenkian e submetido e aprovado pela comissão de ética.

/ Resumo

Introdução: Desde 2007 que desenvolvemos, a nível nacional, um programa de vigilância da emergência de resistência aos antivirais específicos para a gripe no âmbito de um projecto de investigação financiado pela Fundação Calouste Gulbenkian.
Objectivo: Divulgar e discutir os resultados da avaliação da resistência aos antivirais específicos para a gripe que foram coligidos, pela primeira vez em Portugal, no âmbito do programa de vigilância que desenvolvemos para o efeito.
Métodos: Informação sobre prescrição e exposição aos antivirais foi recolhida através do Programa Nacional de Vigilância da Gripe. A susceptibilidade à amantadina foi avaliada por pirosequenciação em 166 estirpes de vírus influenza A isoladas entre 2004/2005 a 2006/2007. A susceptibilidade ao oseltamivir foi avaliada por fluorescência em 298 estirpes de vírus influenza isoladas entre 2004/2005 a 2007/2008, das quais 89 foram posteriormente analisadas por sequenciação da neuraminidase.
Resultados e Conclusão: A informação disponível mostrou uma reduzida prescrição de antivirais para o tratamento da gripe. A única estirpe A(H3N2) de 2005/2006 e 29(72.5%) das 40 estirpes A(H3N2) de 2006/2007 demonstraram ser resistentes à amantadina, apresentando a mutação S31N na sequência da proteína M2. A resistência ao oseltamivir foi identificada em 6 (20.7%) das 29 estirpes A(H1N1) de 2007/2008, através da obtenção de valores de IC_{50} 230 a 560 vezes superiores ao valor mediano e também pela identificação da mutação H275Y na sequência da neuraminidase. Estes resultados contribuem para a investigação realizada a nível europeu e mundial na área da resistência aos antivirais.

Palavras-chave: gripe, antivirais, resistência

/ Abstract

Introduction: Since 2007 we have carried out at national level a surveillance program on influenza antiviral drug resistance supported by a research grant attributed by the Portuguese Calouste Gulbenkian Foundation.

Objective: To disclose and discuss the results on the evaluation of influenza antiviral drug resistance, obtained for the first time in Portugal as part of the surveillance program that we have developed for this purpose.
Methods: Information regarding prescription and exposure to influenza antiviral drugs was collected through the National Influenza Surveillance Program. Amantadine susceptibility was evaluated by pyrosequencing on 166 influenza A virus strains isolated from 2004/2005 to 2006/2007. Susceptibility to oseltamivir was evaluated through fluorescence assay on 298 influenza virus strains isolated from 2004/2005 to 2007/2008, of which 89 were further analysed by neuraminidase gene sequencing.
Results and Conclusion: The available information revealed a rare prescription of antiviral drugs for the treatment of influenza infections. The only A(H3N2) strain isolated during 2005/2006 and 29 (72.5%) of the 40 A(H3N2) strains from 2006/2007 showed to be resistant to amantadine, carrying the mutation S31N in their M2 sequence. Resistance to oseltamivir was identified in 6 (20.7%) of the 29 A(H1N1) strains from 2007/2008 through the exhibition of IC_{50} values between 230 to 560 times higher than the median value and the identification of the mutation H275Y in their NA sequence. These data contribute to the surveillance and research carried out at European and global level on influenza antiviral drug resistance.

Key words: *influenza, antiviral drugs, resistance*

/ Introdução

A gripe é uma doença com uma dimensão global e à qual se encontra associada uma elevada morbilidade e mortalidade[1]. A vacinação é a principal estratégia e a pedra angular da prevenção da gripe, encontrando-se também disponíveis antivirais que podem constituir adjuvantes dessa vacinação, mas com uma utilização limitada. Adicionalmente, estes antivirais específicos para a gripe constituem a única estratégia disponível para o tratamento desta doença do tracto respiratório[2].

Encontram-se, actualmente, disponíveis para uso clínico duas classes de antivirais específicos para a gripe: (1) os inibidores da proteína M2 (amantadina e rimantadina), que actuam na fase inicial do ciclo replicativo do vírus, inibindo o processo de descapsidação viral, e; (2) os inibidores da neuraminidase (oseltamivir e zanamivir), que actuam fundamentalmente no final do ciclo replicativo, inibindo a libertação e promovendo a auto-agregação dos viriões recém-sintetizados[3,4].

Com a introdução destes antivirais na prática clínica foi necessário avaliar o potencial risco de emergência de vírus influenza resistentes. De facto, a emergência de estirpes resistentes aos inibidores da M2 foi identificada em 30 a 80% dos doentes, nas 48 a 72 horas após início da terapêutica antiviral[4]. Acresce que a nível mundial, a partir do Inverno 2002/2003, foi verificado um aumento súbito na percentagem de vírus influenza A(H3N2) resistentes a estes inibidores, que passaram a constituir mais de 90% das estirpes A(H3N2) em circulação na população em 2005/2006[5]. Em menor escala, para o mesmo Inverno de 2005/2006 e também a nível mundial, a percentagem de estirpes de vírus influenza A(H1N1) resistentes foi estimada em 15.6%[5]. Adicionalmente, todos os vírus influenza A(H5N1), aviários e de transmissão zoonótica, pertencentes ao clade evolutivo 1 e 80% dos vírus pertencentes ao clade evolutivo 2.1 exibiram resistência aos inibidores da M2[3].

No que respeita aos inibidores da neuraminidase (NAIs), a situação observada para cada um dos dois antivirais disponíveis é bastante diferente. A emergência de resistência ao zanamivir

tem sido raramente observada, distinguindo-se os dois casos identificados após terapêutica antiviral em doentes imunocomprometidos[6]. Por sua vez, a emergência de estirpes resistentes ao oseltamivir foi detectada em 0.32% dos adultos e em 4.1% das crianças sujeitos a terapêutica antiviral, em ensaios clínicos. Duas frequências mais elevadas, de 18% e 16%, foram estimadas no Japão em estirpes isoladas a partir de crianças. Contudo, estas resistências foram consideradas como uma consequência de uma subdosagem do antiviral durante o tratamento[3]. A emergência de resistência após terapêutica antiviral foi também identificada em cinco casos de infecção humana por vírus influenza A(H5N1) de transmissão zoonótica, notificados no Vietname e no Egipto[6]. A frequência de resistência ao oseltamivir na população em geral foi, até ao Inverno 2006/2007, muito reduzida (inferior a 1%)[7]. No entanto, durante o Inverno 2007/2008 verificou-se a súbita e inesperada emergência de vírus influenza A(H1N1) resistentes ao oseltamivir, num contexto de baixa utilização do antiviral a nível mundial[8]. Acresce que estes vírus resistentes persistiram em 2008/2009, constituindo aproximadamente 95% das estirpes A(H1N1) em circulação na população, de acordo com a informação obtida a nível mundial até 18 de Março de 2009[9].

A existência de redes de vigilância na área da emergência de resistência aos antivirais específicos para a gripe, a nível europeu (European Surveillance Network for Vigilance against Viral Resistance - VIRGIL, em colaboração com o European Influenza Surveillance Sheme - EISS) e a nível mundial (Neuraminidase Inhibitor Susceptibility Network – NISN, associada à WHO Global Influenza Surveillance Network – GISN), possibilitou a rápida detecção e divulgação de informação sobre a emergência de resistência ao oseltamivir nos vírus influenza A(H1N1) em 2007/2008[6]. Este episódio recente demonstrou e reforçou a necessidade e a importância da existência destas redes, para as quais são determinantes a recolha de dados clínicos, virológicos e epidemiológicos e a investigação conduzida em cada país na área da resistência. A nível nacional, desde o início de 2007 é desenvolvido no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, com o apoio e financiamento da Fundação Calouste Gulbenkian, um programa de vigilância e investigação na área da emergência de resistência aos antivirais específicos para a gripe. Este programa tem vindo a ser desenvolvido em estreita colaboração e com as parcerias já estruturadas no âmbito do Programa Nacional de Vigilância da Gripe.

Com este trabalho pretende-se divulgar e discutir os resultados obtidos até à data no âmbito da investigação realizada com base no programa nacional de vigilância da emergência de resistência aos antivirais específicos para a gripe, que desenvolvemos em Portugal.

/ Material e Métodos

As estirpes de vírus influenza analisadas durante este trabalho foram isoladas a partir de exsudados do tracto respiratório recebidos



no âmbito do Programa Nacional de Vigilância da Gripe, através das redes de Médicos Sentinela e dos Serviços de Urgência. A informação clínica e epidemiológica anexada a cada amostra foi também analisada, nomeadamente a informação sobre a prescrição e/ou exposição (por uso ou por contacto com um doente em terapêutica antiviral) a antivirais específicos para a gripe, que incluímos nas folhas de notificação de síndroma gripal desde 2005/2006.

No total, foram avaliadas para a susceptibilidade à amantadina 166 estirpes de vírus influenza A isoladas entre os Invernos 2004/2005 a 2006/2007. A susceptibilidade ao oseltamivir foi avaliada num total de 298 estirpes de vírus influenza isoladas desde 2004/2005 a 2007/2008 (Quadro I).

A susceptibilidade à amantadina foi avaliada genotipicamente por pirosequenciação, através da análise da presença das cinco mutações na sequência da proteína M2 que se encontram associadas ao desenvolvimento de resistência a esta droga antiviral (L26F, V27A/D, A30T, S31N e G34E). Esta metodologia foi efectuada no *Health Protection Agency* (HPA, Londres, Inglaterra), utilizando o protocolo descrito por Bright *et al.* (2005)[10] com as seguintes alterações: (1) na reacção de amplificação do gene M2 foram usados 5µl de RNA viral em 50µl de mistura de reacção e um total de 35 ciclos de amplificação, e; (2) na reacção de pirosequenciação, o primer de sequenciação M2 foi utilizado a uma concentração de 0.44µM/µl e o tempo de hibridação foi reduzido para dois minutos. O facto desta metodologia ter sido realizada no HPA limitou o número de estirpes avaliadas.

A susceptibilidade ao oseltamivir foi avaliada fenotipicamente por ensaio de fluorescência e, posteriormente, a nível genotípico, por sequenciação do gene da neuraminidase (NA). O ensaio de

QUADRO I – NÚMERO (PERCENTAGEM) DE ESTIRPES DE VÍRUS INFLUENZA AVALIADAS POR TIPO/SUBTIPO, INVERNO E METODOLOGIA APLICADA PARA CADA DROGA ANTIVIRAL.

		2004-2005			2005-2006			2006-2007		2007-2008		TOTAL
		A(H3N2)	A(H1N1)	B	A(H3N2)	A(H1N1)	B	A(H3N2)	B	A(H1N1)	B	
Amantadina	Pirosequenciação	75 (84,3)	6 (100)	-	1(100)	44 (95,7)	-	40 (52,6)	-	-	-	166 (67,2)
Oseltamivir	Fluorescência	76 (85,4)	4 (66,7)	33 (94,2)	1 (100)	39 (84,8)	49 (100)	20 (26,3)	2 (100)	29 (100)	45 (100)	298 (78,8)
	Sequenciação	20 (22,5)	3 (50)	1 (2,9)	1(100)	14 (30,4)	2 (4,1)	13 (17,1)	2 (100)	22 (75,9)	11 (24,4)	89 (23,5)

QUADRO II – INFORMAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA E CLÍNICA DOS CASOS EM QUE SE VERIFICOU A PRESCRIÇÃO DE ANTIVIRAL.

Época	Semana	Rede	Distrito	Indivíduo			Antiviral	Resultado infecção vírus influenza
				Sexo	Idade (anos)	Vacinação		
2005/2006	**41**	SU	Beja	F	54	N	NR	Negativo
	44	SU	Bragança	F	69	N	NR	Negativo
	45	SU	Lisboa	F	43	S	NR	**Positivo (B)**
	48	SU	Beja	F	22	N	NR	Negativo
	2	SU	Braga	F	NR	N	NR	Negativo
	3	SU	Braga	M	34	NR	NR	Negativo
2006/2007	**44**	SU	Viseu	M	23	N	Oseltamivir	Negativo
	50	SU	Coimbra	F	31	S	NR	Negativo
	2	SU	Beja	F	29	N	Oseltamivir	Negativo
	5	SU	Beja	F	44	N	Oseltamivir	**Positivo (AH3)**
		SU	Beja	M	27	N	Oseltamivir	**Positivo (AH3)**
	6	MS	Coimbra	M	48	S	Oseltamivir	Negativo
		MS	Portalegre	F	NR	N	NR	Negativo
		SU	Faro	M	50	N	Oseltamivir	**Positivo (AH3)**
	7	SU	Lisboa	M	28	N	Oseltamivir	**Positivo (AH3)**
	8	SU	Beja	M	23	N	Oseltamivir	**Positivo (AH3)**
		SU	Beja	M	39	N	Oseltamivir	Negativo
2007/2008	**47**	SU	Lisboa	M	41	N	NR	Negativo
	51	SU	Beja	M	22	N	Oseltamivir	Negativo
	6	SU	Coimbra	M	29	N	Oseltamivir	**Positivo (B)**
		SU	Beja	M	42	N	Oseltamivir	Negativo
	8	SU	Beja	M	29	N	Zanamivir	Negativo
	10	SU	Aveiro	M	38	N	Oseltamivir	**Positivo (B)**
	13	SU	Aveiro	M	17	N	Oseltamivir	Negativo

SU: Serviço de Urgência; MS: Médico Sentinela; F – Feminino; M: Masculino; S: Sim; N: Não; NR: Não Referido

fluorescência foi efectuado utilizando o *Standard Operating Procedure* disponível online na biblioteca de protocolos de laboratório do EISS (www.eiss.org), baseado na metodologia desenvolvida por Potier *et al.* (1979)[11]. Através deste ensaio foi determinada, para cada estirpe de vírus influenza, a concentração de antiviral necessária para inibir 50% da actividade da NA do vírus (valor de IC_{50}). Com base nos valores obtidos foi posteriormente determinada, para cada subtipo de vírus influenza e Inverno, uma linha de base, definida por um *cut off* inferior e um *cut off* superior correspondentes a, respectivamente, 1.65 e 3 desvios padrão acima do valor mediano. As estirpes com um valor de IC_{50} superior ao *cut off* inferior foram classificadas como *minor outlier* e as com um valor de IC_{50} superior ao *cut off* superior como *major outlier*. Todas as estirpes classificadas estatisticamente como *outliers* e aproximadamente 25% das estirpes não *outliers* (seleccionadas aleatoriamente) foram avaliadas por sequenciação do gene da NA, correspondendo a um total de 89 estirpes

avaliadas (Quadro II). As sequências foram obtidas utilizando o sequenciador automático de DNA ABI PRISM Biosystems 3130XL Genetic Analyser após reacção de sequenciação cíclica com o kit de BigDye Terminator V.1.1., e posteriormente analisadas utilizando o software de análise genética Lasergene V.4.05 (DNASTAR Inc, USA).

/ Resultados

Prescrição e exposição a antivirais específicos para a gripe

Os antivirais foram raramente prescritos para o tratamento da infecção por vírus influenza na população em observação, nas redes de vigilância, e que recorreu aos cuidados primários e secundários durante os Invernos 2005/2006 a 2007/2008. Neste âmbito foi recebido um total de 24 notificações de síndroma gripal com indicação de prescrição de antiviral. Contudo, verificou-se um ligeiro aumento na frequência desta prescrição ao longo dos Invernos analisados, de 1.1% (6/538) em 2005/2006 para 1.5% (11/731) em 2006/2007 e posteriormente para 2.4% (7/289) em 2007/2008. A percentagem de notificações recebidas sem qualquer informação sobre a prescrição de antiviral foi ainda elevada em 2007/2008, apesar da redução de aproximadamente 2 vezes verificada entre os Invernos analisados (de 44.6% (240/538) em 2005/2006 para 22.8% (66/289) em 2007/2008).

Dos 24 casos em que foi indicada a prescrição de antiviral, 21 (87.5%) foram recebidos através da Rede de Serviços de Urgência, com a grande maioria (70.8%) a ser proveniente dos serviços de atendimento permanente dos Centros de Saúde. Em termos de distribuição destes casos no tempo, não foi observado nenhum padrão particular nos 3 Invernos analisados. No que respeita à sua distribuição geográfica, os casos em que se verificou a prescrição de antiviral tiveram origem em 9 dos 18 distritos de Portugal Continental, com uma grande parte dos casos (10;41.6%) a ser proveniente do distrito de Beja. Os antivirais foram maioritariamente prescritos a adultos (20;83.3%), sendo o oseltamivir o antiviral mais utilizado (14;58.3%). A análise laboratorial demonstrou a presença de vírus influenza em apenas 8 (33.3%) dos 24 exsudados do tracto respiratório recebidos e acompanhados das notificações com indicação da prescrição de antiviral (Quadro II).

Entre 2005/2006 e 2007/2008 não foram reportados casos em que se tenha verificado exposição a antivirais específicos para a gripe previamente à consulta e colheita da amostra respiratória. Contudo, nesses Invernos, essa informação foi omissa em aproximadamente 30% do total de notificações de síndroma gripal recebidas.

Susceptibilidade à amantadina

Todas as estirpes de vírus influenza A(H1N1) e as estirpes de vírus influenza A(H3N2) do Inverno 2004/2005 que foram avaliadas por pirosequenciação demonstraram ser susceptíveis à amantadina, uma vez que nenhuma das 5 mutações associadas ao desenvolvimento de resistência a esta droga antiviral foi identificada na sequência da proteína M2 (Figura 2A). No entanto, na sequência da única estirpe A(H3N2) isolada em 2005/2006 e em 29 (72.5%) das 40 estirpes A(H3N2) isoladas em 2006/2007 foi identificada a presença da mutação Ser31Asn (S31N), evidenciando a ocorrência de resistência à amantadina (Figura 2A).

Com base na informação epidemiológica disponível sobre os exsudados do tracto respiratório a partir dos quais foram isoladas as estirpes A(H3N2) de 2006/2007 resistentes, foi possível verificar que estas amostras foram colhidas ao longo de todo o Inverno, de doentes pertencentes a todos os grupos etários e de praticamente todas as regiões de Portugal Continental.

Susceptibilidade ao oseltamivir

A maioria das estirpes de vírus influenza A(H1N1) que foram avaliadas por ensaio de fluorescência exibiram valores de IC_{50} semelhantes entre si e abaixo da linha de base, demonstrando ser susceptíveis ao oseltamivir (Figura 1 e Figura 2B). A análise estatística revelou a presença de 2 *minor* e de 6 *major outliers* ao longo dos 4 Invernos analisados (2004/2005 a 2007/2008) (Figura 1). As 2 estirpes classificadas como *minor outlier*, sendo uma de 2005/2006 e outra de 2007/2008, exibiram uma redução de aproximadamente 2 vezes na susceptibilidade ao oseltamivir, comparativamente com o valor de IC_{50} mediano. No entanto, não foram identificadas na sua sequência da NA quaisquer mutações diferentes das observadas na sequência de outras estirpes de vírus influenza A(H1N1) que circularam no mesmo Inverno, evidenciando a presença de susceptibilidade ao oseltamivir. As 6 estirpes classificadas como *major outlier*, isoladas durante o Inverno 2007/2008, apresentaram uma redução de 230 a 560 vezes na susceptibilidade ao oseltamivir, comparativamente com o valor de IC_{50} mediano, motivo pelo qual foram consideradas potenciais estirpes resistentes. De facto, a análise da sua sequência da NA revelou a presença da mutação His275Tyr (H275Y - numeração N1), associada a um elevado nível de resistência ao oseltamivir, comprovando que 6 (20.7%) das 29 estirpes de vírus influenza A(H1N1) isoladas em 2007/2008 são resistentes a esta droga antiviral (Figura 2B).

A informação epidemiológica disponível mostrou que os exsudados do tracto respiratório, a partir dos quais foram isoladas as estirpes A(H1N1) resistentes, foram colhidos na proximidade e durante o período epidémico de gripe (semana 1 a 9 de 2008), de doentes pertencentes a praticamente todos os grupos etários e com origem em 3 dos 18 distritos de Portugal Continental (Portalegre, Braga e Viana do Castelo).

Relativamente ao subtipo de vírus influenza A(H3N2), todas as estirpes avaliadas por ensaio de fluorescência exibiram valores de IC_{50} semelhantes e abaixo da linha de base, demonstrando ser susceptíveis ao oseltamivir (Figura 1 e Figura 2B).

Tal semelhança não foi observada para os vírus influenza do tipo B. As estirpes isoladas em 2004/2005 exibiram valores de IC_{50} mais baixos do que os valores obtidos

para as estirpes isoladas em 2005/2006. Ao contrário, as estirpes isoladas em 2007/2008 exibiram uma grande amplitude de valores de IC_{50} (Figura 1). Apesar desta variabilidade, os valores de IC_{50} obtidos para praticamente todas as estirpes do tipo B avaliadas por ensaio de fluorescência situaram-se abaixo da linha de base, evidenciando a presença de susceptibilidade ao oseltamivir (Figura 1 e Figura 2B). Apenas 3 estirpes, uma de 2004/2005 e duas de 2005/2006, foram classificadas como *minor outlier* por análise estatística, apresentando somente uma ligeira redução na susceptibilidade ao oseltamivir (inferior a 2 vezes) (Figura 1). Adicionalmente, nenhuma das 5 mutações que até à data se encontram associadas ao desenvolvimento de resistência ao oseltamivir (E119V, D198N, H274Y, R292K, N294S – numeração N2) foram identificadas na sequência da NA, confirmando a susceptibilidade destas 3 estirpes à droga antiviral (Figura 2B).

/ Discussão

Este estudo mostrou que em Portugal entre os Invernos 2005/2006 e 2007/2008 a percentagem de prescrição de antivirais para o tratamento da gripe foi muito reduzida. Durante este período não foram observados casos cuja informação recolhida através da folha de notificação indicasse a exposição dos doentes a antivirais específicos para a gripe, nos dias anteriores à consulta e à colheita do exsudado do tracto respiratório. Estes resultados podem estar associados a vários factores, entre os quais se destaca a fraca adesão à prescrição destas drogas antivirais e aspectos relacionados com o comportamento praticado pelos doentes face à gripe. De facto, para muitos doentes que recorrem aos serviços de saúde, o tempo que mediou entre o início dos sintomas e a consulta torna menos efectivo o uso destas drogas antivirais, conduzindo à sua não prescrição.

No contexto da recolha de informação é ainda importante incentivar os médicos participantes nesta vigilância a preencherem integralmente as folhas de notificação, particularmente as informações relacionadas com a prescrição e/ou exposição aos antivirais.

O aumento de 1.1% para 2.4%, observado na frequência de prescrição de antivirais entre os Invernos analisados, não foi considerado relevante mas realça a necessidade e a importância de continuar a vigiar a emergência de estirpes resistentes aos antivirais a nível nacional.

No período em estudo, os antivirais foram maioritariamente prescritos a adultos, não se encontrando, no entanto, disponível informação acerca da presença de condições de risco entre os doentes tratados. O oseltamivir foi o antiviral mais prescrito, provavelmente tendo em consideração a vantagem relativamente ao zanamivir na via de administração, a sua farmacocinética e ao seu menor perfil de toxicidade comparativamente com os inibidores da proteína M2[4,5].

Neste estudo mostrou-se, também, que foi no Inverno 2005/2006 que se identificou a emergência das primeiras estirpes de vírus influenza A(H3N2) resistentes à amantadina. As estirpes com este

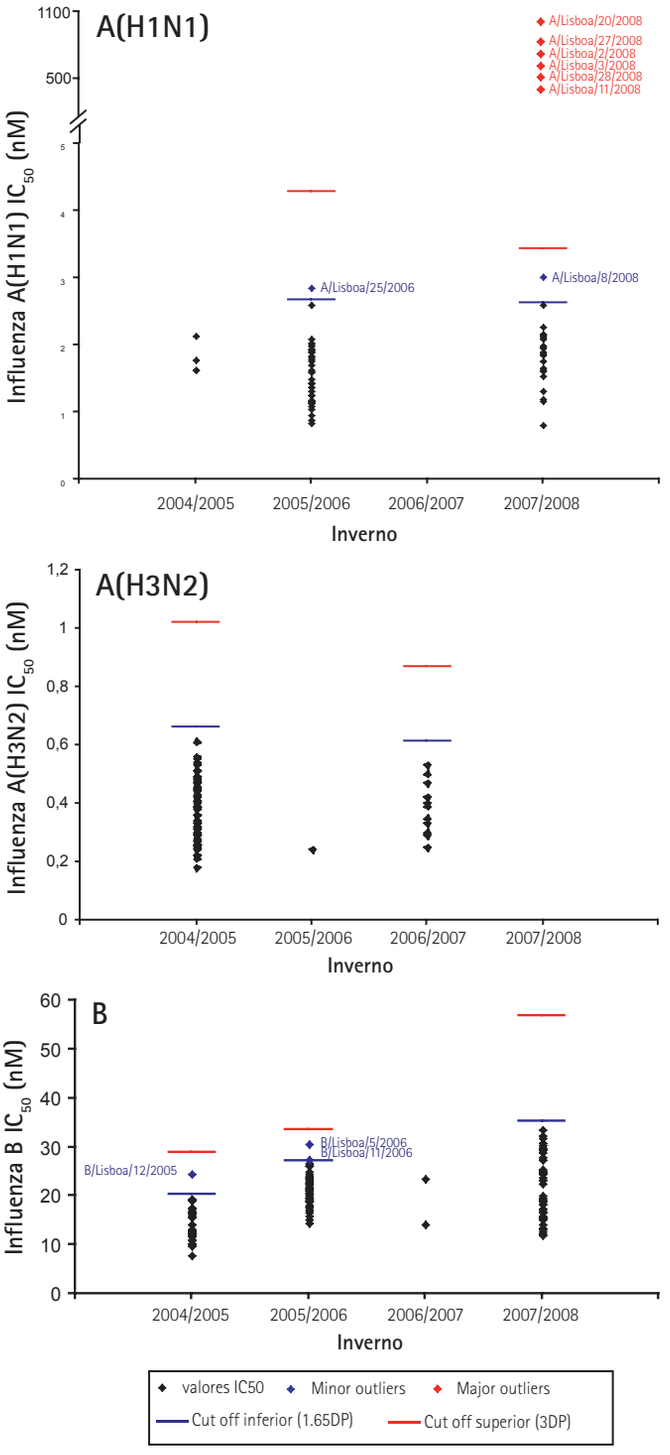

Figura 1 – Valores de IC_{50} obtidos para as estirpes de vírus influenza A(H1N1), A(H3N2) e B ao longo dos Invernos analisados, por ensaio de fluorescência.

perfil persistiram durante o Inverno seguinte (2006/2007), onde 72.5% dos vírus analisados eram resistentes. Durante o mesmo período temporal todas as estirpes de vírus influenza A(H1N1) analisadas foram susceptíveis à amantadina. Estas observações

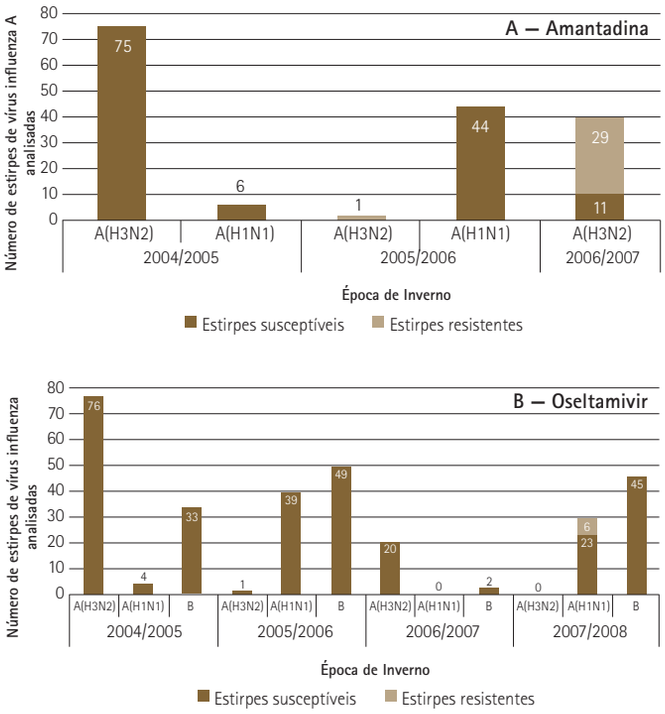

Figura 2 — Número de estirpes de vírus influenza susceptíveis e resistentes à amantadina (A) e ao oseltamivir (B), por tipo/subtipo e Inverno.

estão em conformidade com a elevada e crescente resistência à amantadina que tem vindo a ser observada nos vírus influenza A(H3N2), a nível mundial, particularmente desde 2002/2003[10].

As estirpes A(H3N2) resistentes à amantadina, analisadas neste estudo, apresentaram na sua sequência da proteína M2 a mutação S31N que inibe a ligação do antiviral ao interior do canal iónico constituído por esta proteína, como consequência da diminuição do tamanho e aumento da polaridade no local de ligação ao antivírico[12].

Na origem desta resistência poderá estar a dispersão a nível global de uma estirpe A(H3N2) com a mutação S31N que terá resultado da combinação de dois factores: (1) a pressão selectiva associada ao maior uso de amantadina no Sudeste Asiático (no contexto da síndrome respiratória aguda (SARS) e, posteriormente, do receio da transmissão zoonótica do vírus A(H5N1) associado às extensas epizootias provocadas por este vírus em aves domésticas e selvagens e ao potencial risco de uma nova epidemia mundial de gripe); e (2) a presença de mutações compensatórias no genoma desta estirpe resistente[13-15].

Relativamente ao oseltamivir, 6 (20.7%) das 29 estirpes de vírus influenza A(H1N1) isoladas em 2007/2008 mostraram resistência a esta droga antiviral. A resistência foi identificada através da obtenção de valores de IC_{50} muito elevados, entre 230 a 560 vezes superiores ao valor de IC_{50} mediano, e da identificação da mutação H275Y (numeração N1) na sua sequência da NA. Esta mutação encontra-se associada ao desenvolvimento de resistência ao oseltamivir nos vírus influenza com neuraminidase do subtipo A(N1), impedindo a formação de uma bolsa no sítio activo da NA que é essencial para a ligação do antivírico[16].

Tanto a nível nacional com internacional foi no Inverno de 2007/2008 que se observou pela primeira vez a emergência e a transmissão de estirpes de vírus influenza A(H1N1) resistentes ao oseltamivir que persistiram e aumentaram a sua frequência no Inverno de 2008/2009 [8,9]. A origem e a razão para esta dispersão global de vírus resistentes não se encontra completamente esclarecida mas, dado o baixo consumo de oseltamivir, não se encontra, muito provavelmente, associada ao uso desta droga antiviral[17]. No entanto, pensa-se que a maior capacidade de replicação e transmissão exibida por estes vírus, comparativamente com os outros vírus H275Y resistentes identificados anteriormente, poderá estar associada à presença de mutações compensatórias, localizadas potencialmente em qualquer gene do genoma viral[6]. A continuação da investigação e de estudos específicos na área da emergência de resistência aos antivirais, nos próximos anos, serão contributos essenciais para o conhecimento sobre a emergência de resistência ao oseltamivir.

Todas as estirpes de vírus influenza do subtipo A(H3N2) e do tipo B analisadas neste estudo foram susceptíveis ao oseltamivir. No entanto, a variação temporal observada nos valores de IC_{50} obtidos para as estirpes do tipo B evidencia a ocorrência de uma variação na susceptibilidade ao oseltamivir ao longo dos Invernos analisados (2004/2005 a 2007/2008), sendo que valores de IC_{50} mais elevados são indicativos de uma menor susceptibilidade ao antiviral. Diferenças relacionadas com a circulação predominante de estirpes pertencentes a diferentes linhagens (linhagem B/Yamagata e linhagem B/Victoria) podem explicar o aumento verificado nos valores de IC_{50} entre 2004/2005 (predomínio linhagem B/Yamagata) e 2005/2006 (predomínio linhagem B/Victoria). No entanto, não são suficientes para explicar os valores de IC_{50} mais elevados e com uma maior amplitude obtidos em 2007/2008 (predomínio linhagem B/Yamagata). A realização de uma extensa análise genética e filogenética da NA dos vírus influenza B, envolvendo a sequenciação da NA de um maior número de estirpes, e a continuação da investigação na área da emergência de resistência aos antivirais nos próximos Invernos serão essenciais para uma melhor compreensão da variação observada na susceptibilidade ao oseltamivir e para determinar o impacto das diferenças existentes entre as 2 linhagens B na susceptibilidade a esta droga antiviral.

A divulgação rápida e contínua de toda a informação coligida a nível nacional sobre a resistência aos antivirais específicos para a gripe contribui para a investigação realizada na região europeia e a nível mundial nesta área e na qual se baseiam as recomendações para o uso destes antivirais na prática clínica. Ainda, o facto de muitos países terem constituído uma reserva estratégica de antivirais, como parte do seu Plano de Contingência para uma Pandemia de Gripe, torna também importante a recolha continuada de informação sobre a emergência de resistência aos antivirais específicos para a gripe[6].

/ Bibliografia

1. Rebelo de Andrade H, Diniz A, Froes F. Gripe. Lisboa: Sociedade Portuguesa de Pneumologia; 2003.

2. Kramarz P, Monnet D, Nicoll A, Yilmaz C, Ciancio B. Use of oseltamivir in 12 European countries between 2002 and 2007 – Lack of association with the appearance of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses. Euro Surveill. 2009;14(5).

3. Crusat M, de Jong MD. "Neuraminidase inhibitors and their role in avian and pandemic influenza" [Review]. *Antivir Ther.* 2007;12(4 Pt B):593-602.

4. Democratis J, Pareek M, Stephenson I. "Use of neuraminidase inhibitors to combat pandemic influenza". *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(5):911-5.

5. Deyde VM, Xu X, Bright RA, Shaw M, Smith CB, Zhang Y, et al. "Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide". *J Infect Dis.* 2007;196:249-57.

6. Lackenby A, Thompson CI, Democratis J. "The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza". *Curr Opin Infect Dis.* 2008;21(6):626-38.

7. Lackenby A, Hungnes O, Dudman SG, Meijer A, Paget WJ, Hay A, et al. "Emergence of resistance to oseltamivir among influenza A(H1N1) viruses in Europe". *Euro Surveill.* 2008;13(5).

8. ECDC, 2008. "Oseltamivir resistance in seasonal influenza virus". ECDC Online [actualizado a 9 Outubro de 2008]. http://ecdc.europa.eu/en/Health_Topics/influenza/news/news_Influenza_081009.aspx#oseltamivir.

9. WHO, 2009. "Influenza A(H1N1) virus resistance to oseltamivir – 2008/2009 influenza season, northern hemisphere". WHO Online [actualizado a 18 de Março de 2009]. http://www.who.int/csr/disease/influenza/H1N1webupdate20090318%20ed_ns.pdf.

10. Bright RA, Medina M, Xu X, Perez-Oronoz G, Wallis TR, Davis XM, et al. "Incidence of adamantane resistance among influenza A(H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern". *Lancet.* 2005;366:1175-81.

11. Potier M, Mameli L, Belisle M, Dallaire L, Melancon SB. "Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl-alpha-D-N-acetylneuraminate) substrate". *Anal Biochem.* 1979;94:287-96.

12. Stouffer AL, Acharya R, Salom D, Levine AS, Di Costanzo L, Soto CS, et al. "Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel". *Nature.* 2008; 451:596-9.

13. Hayden FG. "Antiviral resistance in influenza viruses – implications for management and pandemic response". *N Engl J Med.* 2006;354(8):785-8.

14. Simonsen L, Viboud C, Grenfell T, Dushoff J, Jennings L, Smit M, et al. "The genesis and spread of reassortment human influenza A/H3N2 viruses conferring adamantane resistance". *Mol Biol Evol.* 2007;24(8):1811-20.

15. Weinstock DM, Zuccotti G. "Adamantane resistance in influenza A." *JAMA.* 2006;295(8):934-6.

16. Moscona A. "Neuraminidase inhibitors for influenza". *N Engl J Med.* 2005;353(13) :1363-73.

17. Kramarz P, Monnet D, Nicoll A, Yilmaz C, Ciancio B. "Use of oseltamivir in 12 European countries between 2002 and 2007 – Lack of association with the appearance of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses". *Euro Surveill.* 2009;14(5).