

## Perfil de suscetibilidade do vírus influenza aos antivirais específicos para a gripe de 2004 a 2011

Vanessa Correia, Luís André Santos, Helena Rebelo de Andrade  
h.rebelo.andrade@insa.min-saude.pt

Unidade de Investigação e Desenvolvimento.  
Departamento de Doenças Infecciosas, INSA.

A emergência de resistências aos antimicrobianos constitui uma das grandes preocupações de saúde pública, sendo considerada sempre que um novo medicamento é licenciado para uso clínico<sup>(1)</sup>. No caso dos antivirais específicos para a gripe, a resistência pode emergir não apenas como resultado do tratamento ou profilaxia com o medicamento antiviral mas também espontaneamente na comunidade<sup>(2)</sup>. A possibilidade de emergência de estirpes de vírus influenza naturalmente resistentes, conjugada com a elevada e rápida taxa de evolução que caracteriza estes vírus, impõe uma observação ativa e sustentada do perfil de suscetibilidade aos antivirais dos vírus influenza que circulam na população. A realização destas atividades de observação, individualmente em cada país, contribui e é fundamental para a representatividade e robustez dos dados analisados e reportados pelos sistemas de vigilância europeu (ECDC) e mundial (OMS), nos quais se baseiam as recomendações para o uso destes antivirais na prática clínica.

Em 2007 começou a ser desenvolvido pela primeira vez em Portugal um estudo na área da resistência aos antivirais específicos para a gripe, com o principal objetivo de avaliar a suscetibilidade dos vírus influenza circulantes (retrospectivamente desde o Inverno 2004/2005) aos três antivirais autorizados para uso clínico a nível nacional: oseltamivir e zanamivir (inibidores da neuraminidase, NAI) e amantadina (inibidor da proteína M2). Neste trabalho são apresentados de forma resumida os principais resultados e conclusões deste estudo, abrangendo 7 épocas de Inverno, de 2004/2005 a 2010/2011, descritos com maior detalhe em outras publicações da equipa de investigação<sup>(3,4,5)</sup>.

A avaliação laboratorial da suscetibilidade aos NAIs inclui uma componente fenotípica (valor de IC<sub>50</sub>) e uma componente genotípica (sequenciação da região codificante completa da neuraminidase, NA, e da hemaglutinina, HA). No total, foi avaliado o perfil fenotípico de 482 estirpes para o oseltamivir (117 A(H3N2), 93 A(H1N1) sazonal, 130 B, 142 A(H1N1)pdm09) e de 439 estirpes para o zanamivir (112 A(H3N2), 68 A(H1N1) sazonal, 117 B, 142 A(H1N1)pdm09). Destas, 186 estirpes (50 A(H3N2), 61 A(H1N1) sazonal, 25 B,

50 A(H1N1)pdm09) foram analisadas genotipicamente. A avaliação da suscetibilidade à amantadina é definida genotipicamente (sequenciação do segmento da proteína M2 que inclui os 5 marcadores moleculares de resistência: L26F; V27A/D; A30T; S31N e G34E), tendo sido realizada num total de 322 estirpes (138 A(H3N2), 84 A(H1N1) sazonal, 117 A(H1N1)pdm09).

### Inibidores da Neuraminidase (NAIs) – oseltamivir e zanamivir

Foram detetadas 27 (29%, N=93) estirpes do subtipo A(H1N1) sazonal naturalmente resistentes ao oseltamivir, entre os Invernos 2007/2008 a 2008/2009, com base na extrema redução de suscetibilidade observada a nível fenotípico (170 a 650 vezes) e na presença do marcador genético de resistência clínica H275Y na sequência da NA (Gráfico 1 O). Este resultado está de acordo com a emergência e transmissão global de estirpes A(H1N1) sazonal resistentes ao oseltamivir, detetada a partir de 2007/2008 e cuja razão ainda não se encontra completamente esclarecida<sup>(6)</sup>. As mesmas condições de resistência foram observadas em 1 estirpe da variante pandémica com associação ao uso do antiviral num caso de suspeita de resistência clínica (Gráfico 1 O). O marcador NA H275Y foi também identificado, mas em 26,2% da população viral, noutro caso de infeção por A(H1N1)pdm09 com suspeita de resistência clínica. Foram ainda detetadas 3 estirpes com suscetibilidade reduzida a ambos os NAIs (oseltamivir e zanamivir), 1 estirpe de vírus influenza do tipo B de 2007/2008 e 2 estirpes da variante A(H1N1)pdm09 do período pandémico. Estas estirpes apresentaram um valor de IC<sub>50</sub> 2 a 4 vezes superior à linha base e mutações na sequência da NA (NA D197N – B; NA I223V – A(H1N1)pdm09) já associadas a uma redução na suscetibilidade, embora com impacto clínico desconhecido (Gráfico 1 O e Gráfico 1 Z)<sup>(7)</sup>. A mutação NA N220K, localizada no domínio catalítico da proteína, foi selecionada para estudos posteriores, dada a sua presença específica em 3 estirpes de vírus influenza do tipo B com valores de IC<sub>50</sub> 2 vezes superiores à linha base de suscetibilidade para o oseltamivir.

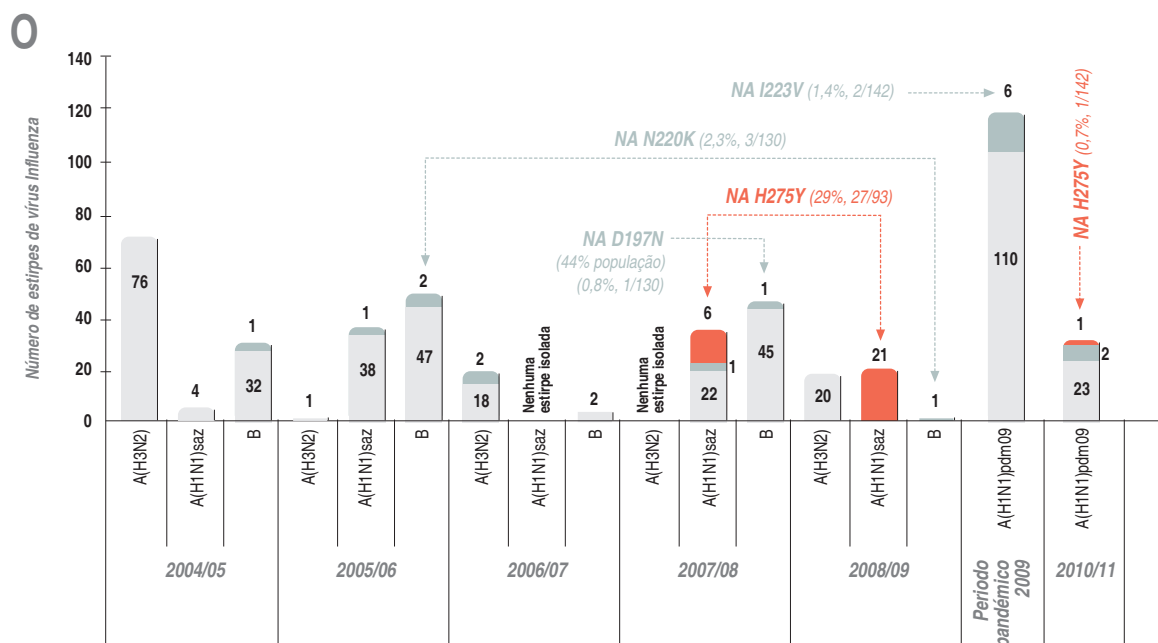
### Amantadina

A resistência à amantadina foi observada em 49 estirpes A(H3N2) (35,5%, N=138) dos Invernos de 2005/2006 a 2008/2009 e em todas as estirpes A(H1N1)pdm09 analisadas, através da identificação do marcador de resistência S31N na sequência da proteína M2. Estes resultados encontram-se em conformidade com a situação observada a nível mundial. Desde o Inverno 2002/2003 que o número de estirpes A(H3N2) resistentes à amantadina isoladas a nível mundial foi aumentando exponencialmente, atingindo praticamente os 100% em 2008/2009. A combinação de um uso elevado deste medicamento antiviral no Sudeste Asiático com a ocorrência de mutações compensatórias no genoma do vírus é considerada como a causa mais provável para o aumento abrupto no número de estirpes resistentes<sup>(8)</sup>. A variante A(H1N1)pdm09 é caracterizada desde a sua emergência por uma resistência natural à amantadina, adquirida como resultado da origem suína Euroasiática do gene M que codifica para a proteína M2.

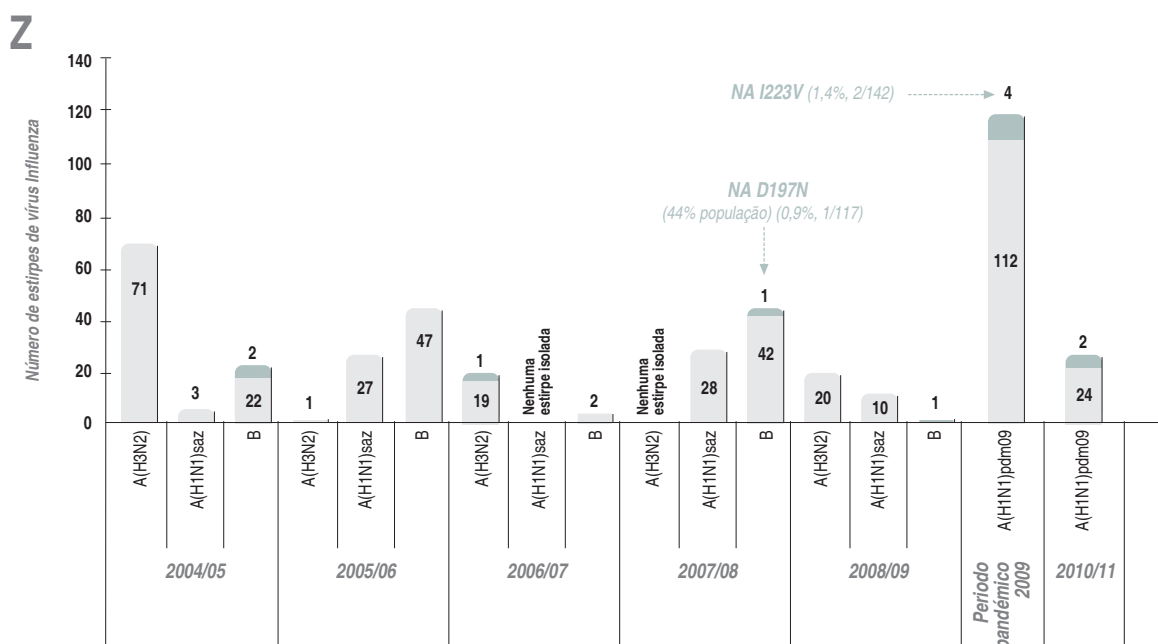
→ continua

artigos breves\_ n. 5

**Gráfico 1 :** Perfil fenotípico de suscetibilidade ao oseltamivir (O) e ao zanamivir (Z) de estirpes de vírus influenza que circularam em Portugal entre os Invernos 2004/2005 a 2010/2011, apresentado por (sub)tipo/variente e época de Inverno e com indicação das mutações específicas e relevantes identificadas a nível genotípico.



(Sub) Tipo ou variante de vírus Influenza / Época de Inverno



(Sub) Tipo ou variante de vírus Influenza / Época de Inverno

■ Suscetível - Inibição Normal (redução <10x linha de base - Influenza A; redução <5x linha de base - Influenza B)  
 ■ Inibição normal mas outlier estatístico  
 ■ Inibição Reduzida (redução entre 10 - 100x linha de base - Influenza A; redução 5 - 50x linha de base - Influenza B)  
 ■ Inibição Extremamente Reduzida (redução >100x linha de base - Influenza A; redução >50x linha de base - Influenza B)

→ continua

artigos breves\_ n. 5

Este estudo permitiu conhecer o perfil de suscetibilidade das estirpes de vírus influenza que circulam em Portugal aos medicamentos antivirais oseltamivir, zanamivir e amantadina; observar e conhecer o padrão de variação natural da suscetibilidade dos vírus ao longo dos diferentes Invernos, de acordo com o (sub)tipo/variante; detetar casos de emergência natural de estirpes resistentes; e analisar e estudar casos com suspeita de resistência clínica. Permitiu igualmente contribuir de modo ativo para as recomendações e orientações técnicas elaboradas pelos grupos europeu do ECDC e mundial da OMS (9,10).

Referências bibliográficas:

- (1) Zambon M, Hayden FG. Position statement: global neuraminidase inhibitor susceptibility network. *Antiviral Res.* 2001; 49(3):147-56. Review.
- (2) Hayden FG, de Jong MD. Emerging influenza antiviral resistance threats. *J Infect Dis.* 2011; 203(1):6-10.
- (3) Correia V, Rebelo de Andrade H, Santos LA, et al. Antiviral drug profile of seasonal influenza viruses circulating in Portugal from 2004/2005 to 2008/2009 winter seasons. *Antivir Res.* 2010; 86(2010): 128-136.
- (4) Santos LA, Correia V, Gíria M, et al. Genetic and Antiviral Drug Susceptibility Profiles of Pandemic A(H1N1)v Influenza Virus Circulating in Portugal. *Influenza Other Respi Viruses.* 2011; 5 (Suppl. 1): 294-300.
- (5) Gíria MT, Rebelo de Andrade H, Santos LA, et al. Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09. *J Clin Virol.* 2012; 53(2):140-144.
- (6) Renaud C, Kuypers J, Englund JA. Emerging oseltamivir resistance in seasonal and pandemic influenza A/H1N1. *J Clin Virol.* 2011; 52(2):70-78.
- (7) Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther.* 2012; 17(1 Pt B):159-73.
- (8) Deyde VM, Xu X, Bright RA, et al. Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A(H3N2) and A(H1N1) viruses isolated worldwide. *J Infect Dis.* 2007; 196:249-257.
- (9) Pozo F, Lina B, Andrade HR, et al. Guidance for clinical and public health laboratories testing for influenza virus antiviral drug susceptibility in Europe. *J Clin Virol.* 2013; doi:pii: S1386-6532(13)00033-4.10.1016/j.jcv.2013.01.009.
- (10) World Health Organization. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012; 87(39):369-374.