

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA**

**MARCELO COMERLATO SCOTTA**

**Associação dos níveis de interferon com a gravidade da infecção por influenza em  
pacientes pediátricos.**

**Orientadora: Profa. Dra. Rita Mattiello**

**Porto Alegre,  
2016**

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**Associação dos níveis de interferon com a gravidade da infecção por influenza em  
pacientes pediátricos.**

Autor: Marcelo Comerlato Scotta

Orientadora: Profa. Dra. Rita Mattiello

Porto Alegre

2016

---

---

MARCELO COMERLATO SCOTTA

**Associação dos níveis de interferon com a gravidade da infecção por influenza em  
pacientes pediátricos.**

Tese apresentada como requisito para a obtenção  
do grau de Doutor pelo Programa de Pós-  
Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da  
Faculdade de Medicina da Pontifícia  
Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Mattiello

Porto Alegre

2016

---

---

S431a Scotta, Marcelo Comerlato

Associação dos níveis de interferon com a gravidade da  
infecção por influenza em pacientes pediátricos / Marcelo  
Comerlato Scotta . – 2016.

77 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em  
Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Mattiello.

1. influenza humana. 2. interferons. 3. imunidade inata. 4. criança.  
5. lactente. I. Mattiello, Rita. II. Título.

---



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

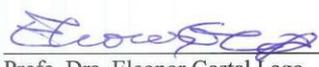
ATA DE DEFESA DE TESE Nº 063-P

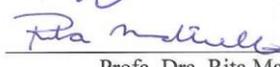
Ao vigésimo nono dia do mês de agosto do ano de dois mil e dezesseis, no Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança (Doutorado) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul o doutorando **Marcelo Comerlato Scotta** apresentou a Tese de Doutorado intitulada “**Associação dos níveis de interferon com a gravidade da infecção por influenza em pacientes pediátricos**”, sob a orientação da Professora Doutora Rita Mattiello, em sessão pública, na Sala de Aula do IPB, 2º andar do Hospital São Lucas da PUCRS. A Comissão Examinadora foi presidida pela Professora Doutora Rita Mattiello e constituída pelos Professores: Dr. Marco Aurélio Palazzi Sáfyadi, Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior e Dra. Eleonor Gastal Lago. A sessão foi aberta pela Professora Doutora Rita Mattiello, Orientadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, que saudou aos presentes e, inicialmente, deu ao doutorando as orientações sobre o processo de defesa de tese concedendo-lhe cinquenta minutos para expor o trabalho. Após a exposição, o doutorando foi arguido pelos componentes da Comissão Examinadora, respondendo a cada examinador. Encerrada a arguição os examinadores consideraram o candidato **APROVADO**. A presidente da banca comunicou a aprovação do doutorando, encerrando a sessão pública de apresentação para constar, lavrou-se esta ata que será assinada pelos integrantes da Comissão Examinadora, pelo professor orientador, pelo Coordenador do Programa de Pós-graduação em Medicina/Pediatria e Saúde da Criança, pelo doutorando e por mim, Carla Carmo de Melo Rothmann, secretária que a redigi.

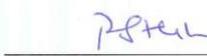
Porto Alegre, 29 de agosto de 2016.

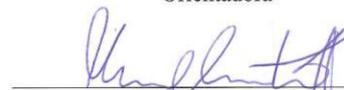
  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marco Aurélio Palazzi Sáfyadi

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Carlos Rodrigues Júnior

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Eleonor Gastal Lago

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Rita Mattiello  
Orientadora

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Renato Tetelbom Stein  
Coordenador

  
\_\_\_\_\_  
Marcelo Comerlato Scotta  
Doutorando

  
\_\_\_\_\_  
Srª. Carla Carmo de Melo Rothmann  
Secretária

---

***Dedicatória***

*Aos meus pais, que sempre priorizaram a minha educação e me estimularam a despertar minha curiosidade e minha paixão pelo conhecimento.*

*À minha esposa Amanda, pela parceria de todas as horas e compreensão nos momentos de dedicação ao estudo.*

*Aos professores Rita Mattiello e Renato Tetelbom Stein, tanto pela orientação quanto pelo convite para realização do doutorado na PUCRS que originou grandes oportunidades profissionais na assistência, na docência médica e em realização de pesquisa em alto nível.*

---

---

## AGRADECIMENTOS

A professora Rita Mattiello, pelos ensinamentos e orientação neste trabalho.

Aos pacientes e suas famílias, pois sem seu consentimento esta pesquisa não seria possível.

Ao professor Fernando P. Polack, por ter auxiliado com esta valiosa ideia de pesquisa.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança da PUCRS Renato Tetelbom Stein, Leonardo Araújo Pinto, Marcus Herbert Jones, Paulo Márcio Condessa Pitrez, Bárbara Nery Porto e Ana Paula Duarte de Souza pelo valioso auxílio na realização do estudo.

À chefia do Serviço de Pediatria, professor Pedro Celiny Ramos Garcia, por autorizar a realização desta pesquisa no Hospital São Lucas da PUCRS.

Aos colegas de Pós-Graduação e do Instituto de Pesquisa Biomédicas Denise Greff, Suelen Goecks de Oliveira, Ângela de Moura, Patrícia Dias de Araújo, Geovana R. Estorgato e Krist Helen Antunes Fernandes pelo auxílio na coleta e análise dos dados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pela bolsa de doutorado e pelo financiamento do estudo.

À Carla Rothmann, por todos os esclarecimentos durante o doutorado e formatação da tese.

---

---

*“Se consegui ver  
mais longe, foi  
porque estive  
apoiado em ombros  
de gigantes”.*

Isaac Newton,  
Físico e matemático inglês que, assim  
como eu, descobriu que pesquisa  
científica não se faz sem grandes  
parceiros.

---

---

## RESUMO

**Introdução/objetivo:** Interferon tipo I exerce um papel central na resposta imune inata contra a infecção por influenza de acordo com dados experimentais. Evidências em humanos ainda são incipientes e a caracterização da resposta do interferon pode auxiliar na estratificação de risco. Nosso objetivo é comparar os níveis de interferon- $\alpha$  em secreções respiratórias entre pacientes hospitalizados e ambulatoriais com infecção por influenza confirmada laboratorialmente.

**Métodos:** Foram incluídos prospectivamente pacientes com idade inferior a cinco anos com síndrome gripal atendidos no hospital com menos de 72 horas do início do quadro clínico. Dados clínicos e demográficos, além de secreções respiratórias através de lavado nasal foram coletados. A infecção por influenza foi confirmada por Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction. Níveis respiratórios de interferon- $\alpha$  foram aferidos por ELISA. Os pacientes incluídos, inclusive os não hospitalizados, foram seguidos até o final do quadro clínico. Pacientes com infecção por influenza descartada foram utilizados como grupo controle.

**Resultados:** Vinte e quatro pacientes com infecção por influenza confirmada foram incluídos, cinco destes hospitalizados. Os subtipos A(H3N2) e B foram confirmados em dez e quatorze pacientes, respectivamente. Setenta e seis pacientes sem influenza, 39 desses hospitalizados, foram utilizados como controles. A idade inferior a seis meses foi significativamente mais frequente nos pacientes hospitalizados, com ou sem influenza (59% vs 23.2%,  $p < 0.01$ ). Todas as outras variáveis clínicas e demográficas foram semelhantes entre os grupos. Os níveis de interferon- $\alpha$  foram significativamente maiores em crianças com influenza não hospitalizadas em comparação com crianças hospitalizadas com influenza e com os controles hospitalizados e não hospitalizados ( $p < 0.001$ ). A mediana em pg/ml (amplitude interquartil) foi 263.2 (58.3-634), 0 (0-49), 0 (0-2.6) e 0 (0-19.4) nos quatro grupos acima, respectivamente.

**Conclusão:** Os níveis mais baixos de interferon- $\alpha$  nos pacientes com quadros mais graves de influenza reforçam evidências experimentais sobre o papel protetor do interferon na infecção por esse vírus.

**Palavras-chaves:** influenza humana, interferons, imunidade inata, criança, lactente.

---

---

## ABSTRACT

**Background/Aim:** According to experimental data, interferon type I has a key role in innate immune response against influenza infection. Studies on humans are still scarce and the characterization of interferon response in children may help to identify patients at risk. Our aim is to compare respiratory levels of interferon- $\alpha$  and influenza disease severity in pediatric patients.

**Methods:** Children aged less than five years of age with influenza-like illness seeking pediatric care within the first 72 hours of disease onset were prospectively included. Clinical and demographic data and respiratory secretions through nasal wash were obtained. Influenza infection was confirmed with Reverse-Transcription Polymerase Chain Reaction and respiratory levels of interferon- $\alpha$  were measured by ELISA. Enrolled individuals were followed until the end of disease. Patients whose influenza infection was excluded were used as control group.

**Results:** Twenty four patients with confirmed influenza infection were included, five of them requiring hospitalization. Subtypes A(H3N2) and B were confirmed in ten and fourteen patients, respectively. Seventy-six patients without influenza, 39 of them hospitalized, were included as controls. Age younger than 6 months was significantly more frequent in individuals from both hospitalized groups compared to outpatients (59% vs 23.2%,  $p < 0.01$ ). All other clinical and demographical data were similar among groups. Median levels of interferon- $\alpha$  were significantly higher in outpatients with influenza than both inpatients with influenza and patient without influenza, hospitalized or not ( $p < 0.001$ ). Median in pg/ml (interquartile amplitude) were 263.2 (58.3-634), 0 (0-49), 0 (0-2.6) and 0 (0-19.4) in four groups above, respectively.

**Conclusion:** Lower levels of interferon- $\alpha$  in patients with more severe influenza reinforce experimental evidence about its protective role in influenza infection severity.

**Keywords:** human influenza, interferons, innate immunity, child, infant.

---

---

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal por semana epidemiológica de início dos sintomas - 2015. .... 15
- Figura 2.** Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal por semana epidemiológica de início dos sintomas - 2016 16

### CAPÍTULO II

- Supplemental Figure 1:** Meta-analysis for length of supplemental oxygen comparing patients with viral coinfections and single infections in three age groups..... 46
- Supplemental Figure 2:** Meta-analysis for risk of need of supplemental oxygen comparing patients with viral coinfections and single infections in three age groups. .... 47
- Supplemental Figure 3:** Meta-analysis for risk of admission to PICU comparing patients with viral coinfections and single infections in three age groups.... 48
- Supplemental Figure 4:** Meta-analysis for risk of mechanical ventilation before sensitivity analysis comparing patients with viral coinfections and single infections in three age groups..... 49
- Supplemental Figure 5:** Funnel plot of outcomes: (A) length of stay, (B) need of hospitalization, (C) length of supplemental oxygen, (D) need of supplemental oxygen, (E) need of PICU, (F) need of mechanical ventilation, (G) need of mechanical ventilation after sensitivity analysis, (H) Death..... 50

### CAPÍTULO III

- Figure 1.** Flowchart of patients inclusion and follow-up..... 63
- Figure 2.** Comparison among nasal wash levels of IFN- $\alpha$  (pg/ml) in all four groups... 64
-

---

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1** - Comparação dos casos de síndrome respiratória aguda grave confirmados para Influenza, por semana epidemiológica de início de sintomas, no mesmo período de 2014 e 2015 no Rio Grande do Sul. .... 16
- Tabela 2** - Tabela do número de casos e óbitos segundo a classificação final dos casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave e vírus respiratório identificado, em 2016, no Rio Grande do Sul..... 17

### CAPÍTULO II

- Supplemental Table 2.** Risk of bias within studies. .... 51

### CAPÍTULO III

- Table 1.** Main clinical and demographic characteristics in all four groups compared ..... 62
-

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ARI** = acute respiratory infections;

**CI** = confidence interval;

**EPHPP** = effective public health practice project;

**HA** = hemaglutinina;

**IFD** = imunofluorescência direta;

**IFN** = interferon;

**ILI** = influenza-like illness;

**IQ** = interquartile range;

**ISG** = interferon stimulated genes;

**MD** = mean difference;

**NA** = neuraminidase;

**NS1** = proteína não estrutural tipo 1; non-structural protein 1;

**OR** = odds ratio;

**PICU** = pediatric intensive care unit;

**RIG-I** = retinoic inducible gene-I;

**RNA** = ácido ribonucleico;

**RSV** = respiratory syncytial virus;

**RT-PCR** = reverse transcription polymerase chain reaction

**SD** = standard deviation;

**SG** = síndrome gripal;

**TLR** = toll-like receptors;

---

---

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	<b>13</b>
1.1 INTRODUÇÃO .....	14
1.1.1 Vírus Influenza.....	14
1.1.2 Epidemiologia .....	15
1.1.3 Patogênese.....	17
1.1.4 Quadro clínico.....	19
1.1.5 Testes diagnósticos.....	20
1.1.6 Fatores prognósticos.....	21
1.2 JUSTIFICATIVA.....	24
1.3 OBJETIVO.....	25
1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	26
<b>CAPÍTULO II</b> .....	<b>33</b>
2.1 ARTIGO ORIGINAL 1 .....	34
<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>54</b>
3.1 ARTIGO ORIGINAL 2 .....	55
<b>CAPÍTULO IV</b> .....	<b>73</b>
4.1 CONCLUSÕES.....	74
<b>ANEXO</b> .....	<b>77</b>
ANEXO I- APROVAÇÃO CEP .....	78

---

---

# CAPÍTULO I

---

## 1.1 INTRODUÇÃO

### 1.1.1 Vírus Influenza

O vírus influenza pertence à família Orthomyxoviridae. Medindo 80 a 120 nm de diâmetro, apresenta fita única de ácido ribonucleico (RNA), contendo oito segmentos, estes com capacidade de replicação semiautônoma e rearranjos aleatórios. Possui três principais tipos antigênicos – A, B e C – com múltiplos subtipos, destacando-se o tipo A, o mais virulento. Para os tipos A e B, as duas glicoproteínas de membrana que têm importância antigênica são a Hemaglutinina (HA) e a Neuraminidase (NA). Esses antígenos são específicos para cada subtipo e variáveis, sendo utilizados para classificar os subtipos. Anticorpos anti-HA neutralizam a replicação viral e são os principais marcadores de imunidade em humanos. Três principais tipos de HA são frequentes nos vírus influenza A patogênicos em humanos – H1, H2 e H3 – e dois de NA – N1 e N2 – embora outros tipos dessas glicoproteínas possam eventualmente ter importância clínica (1, 2).

As variações da HA e da NA são a base para as mudanças antigênicas menores (*antigenic drift*) e maiores (*antigenic shift*). O *antigenic drift* ocorre nos vírus influenza A e B e corresponde a mudança pequena em uma ou duas das glicoproteínas que não chega a modificar o subtipo, sendo associado às pequenas variações antigênicas que ocorrem anualmente. O *antigenic shift* ocorre apenas no tipo A, sendo relacionado com mudança antigênica mais radical, geralmente resultado de rearranjo genético de HA ou NA entre influenza humano e de animais e não apenas de mutações pontuais. Este é o mecanismo associado ao surgimento de epidemias e pandemias, pois dá origem a um subtipo novo não reconhecido pelo sistema imunológico humano. O vírus influenza A apresenta a maior variedade de hospedeiros animais, e alguns destes, especialmente suínos e aves, acabam sendo verdadeiros reservatórios de vírus com potenciais de causar pandemias em humanos (3).

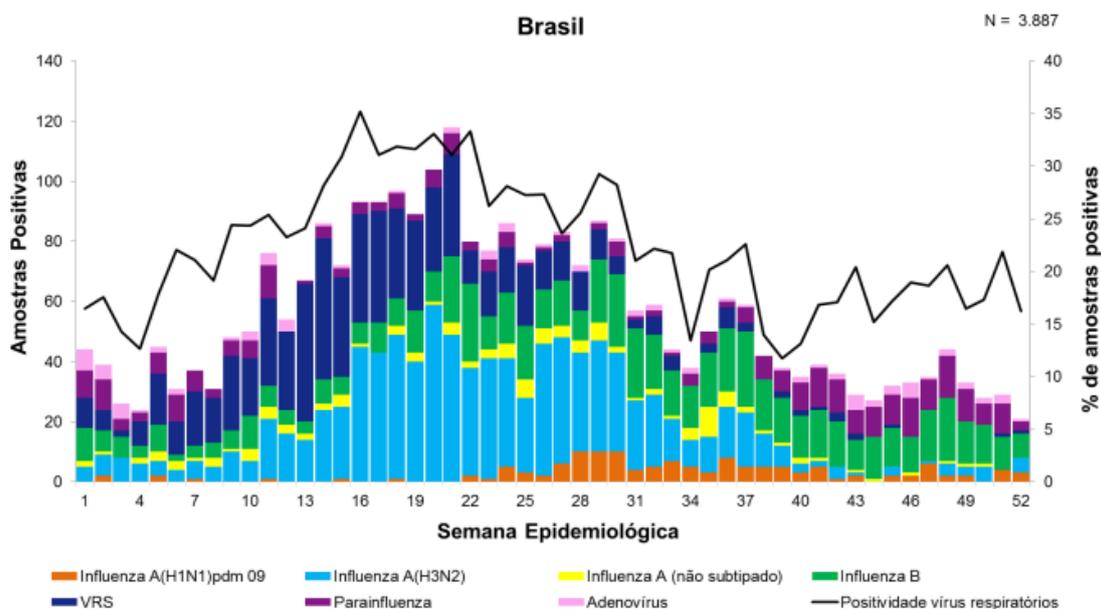
---

## Introdução

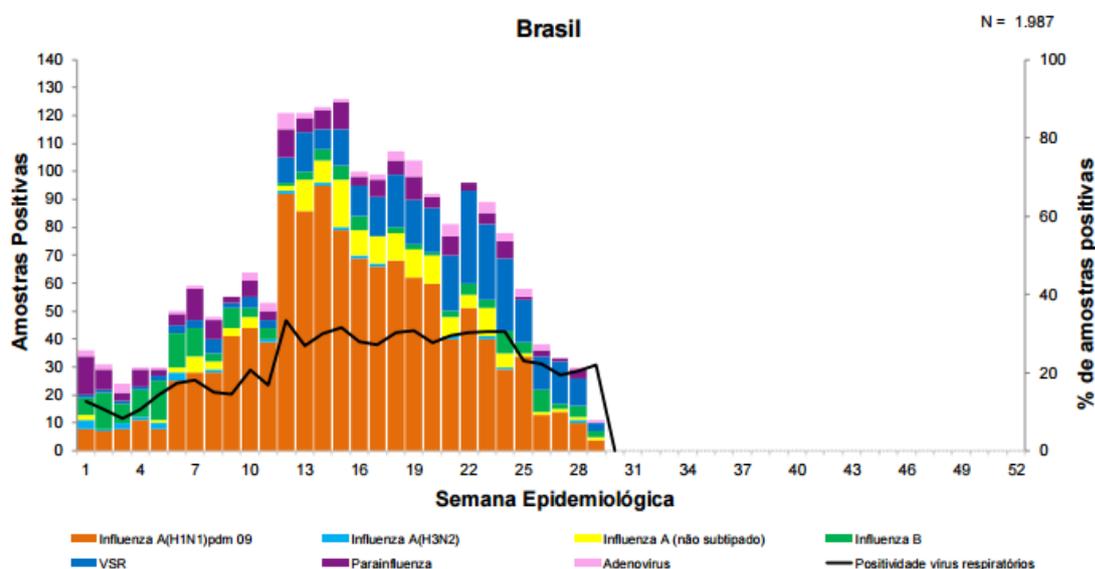
### 1.1.2 Epidemiologia

O vírus influenza é o principal causador da síndrome gripal (SG) em todas as faixas etárias. Apresenta três subtipos predominantes: influenza A(H3N2), também conhecido como influenza sazonal, influenza A(H1N1)pdm09, oriundo de um rearranjo genético e causador da pandemia de 2009-2010 e influenza B, basicamente com as linhagens antigênicas Victoria e Yamagata (4-6). Apresenta importante impacto na população pediátrica, especialmente em menores de 5 anos, com estimativa de 90 milhões de episódios, 1 a 2 milhões de infecções respiratórias graves e 278000 óbitos anualmente, com mortalidade entre 0,21 a 0,88/100000, sendo a maioria dos óbitos em países em desenvolvimento (6, 7).

No Brasil, houve predomínio do subtipo influenza A(H1N1)pdm09 após o início da pandemia em 2009-2010. Após esse período, os subtipos A(H3N2) e B progressivamente voltaram a predominar até 2015, conforme ilustrado por dados coletados de unidades sentinelas de SG demonstrados na Figura 1 (8). Entretanto, em 2016 o subtipo influenza A(H1N1)pdm09 voltou a predominar, com pico de detecção entre a 12<sup>a</sup> e a 14<sup>a</sup> semana epidemiológica, conforme Figura 2 (9).



**Figura 1.** Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal por semana epidemiológica de início dos sintomas. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, dados atualizados em 29/02/2016 e acessados em 02/07/2016.



**Figura 2.** Distribuição dos vírus respiratórios identificados nas unidades sentinelas de Síndrome Gripal por semana epidemiológica de início dos sintomas. Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, dados atualizados em 03/08/2016 e acessados em 16/08/2016.

No Rio Grande do Sul, com dados de vigilância realizada com base em síndrome respiratória aguda grave, durante o ano de 2015 houve um menor número de casos que nos anos anteriores no mesmo período do ano, com 88 casos e 9 óbitos, com predomínio do subtipo A(H3N2), conforme Tabela 1 (10). Semelhante ao ocorrido no restante do país, houve um aumento do número de casos em 2016, com predomínio do subtipo A(H1N1)pdm09, ilustrado na Tabela 2 (11).

**Tabela 1** - Comparação dos casos confirmados de síndrome respiratória aguda grave por influenza, por semana epidemiológica de início de sintomas, no mesmo período de 2014 e 2015 no Rio Grande do Sul.

Tipo e subtipo de Influenza	SE 52_2015		SE 52_2014	
	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos
Influenza A (H1N1)	1		29	12
Influenza A (H3N2)	51	6	143	13
Influenza B	27	2	17	
Influenza A não subtípado	9	1	1	
<b>TOTAL</b>	<b>88</b>	<b>9</b>	<b>189</b>	<b>25</b>

Fonte: Boletim de Vigilância em Influenza/RS – Semana epidemiológica 52/2015 (até 02/01/2016), acessado em 02/07/2016.

## Introdução

---

**Tabela 2** - Tabela do número de casos e óbitos segundo a classificação final dos casos de síndrome respiratória aguda grave e vírus respiratório identificado, em 2016, no Rio Grande do Sul.

<b>Classificação final</b>	<b>CASOS</b>	<b>ÓBITOS</b>
<b>Influenza</b>	<b>1216</b>	<b>191</b>
<i>Influenza A (H1N1)</i>	1096	177
<i>Influenza A (H3N2)</i>	2	0
<i>Influenza A não subtipado</i>	118	14
<i>Influenza B</i>	0	0
<b>outros vírus</b>	<b>715</b>	<b>9</b>
<i>Vírus sincicial respiratório (VSR)</i>	668	8
<i>Adenovírus</i>	20	0
<i>Parainfluenza</i>	27	1
<b>Sem identificação viral</b>	<b>2287</b>	<b>266</b>
<b>Outro agente etiológico</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
<b>Em investigação</b>	<b>178</b>	<b>1</b>
<b>Notificados</b>	<b>4399</b>	<b>469</b>

Fonte: Boletim de Vigilância em Influenza/RS – Semana epidemiológica 32/2016 (até 11/08/2016), acessado em 16/08/2016.

### 1.1.3 Patogênese

A patogênese da infecção por influenza consiste em uma interação complexa entre a resposta imune do hospedeiro e fatores associados ao vírus. A infecção induz a ativação tanto da resposta imune inata quanto da resposta adaptativa do hospedeiro. A imunidade específica inclui células de memória T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, células B de memória de longa duração e produção de anticorpos específicos anti-HA. Evidências em estudos experimentais indicam que a secreção do interferon, especialmente o tipo I (alfa e beta) e tipo III (lambda), tem um papel fundamental na resposta imunológica inata contra o vírus influenza na via aérea, inibindo a replicação viral e permitindo o início de resposta imune específica. Em modelos animais, a produção deficiente de interferon tipo I e III aumenta a gravidade da infecção por influenza (1, 12-14).

A produção de interferon é estimulada pelo reconhecimento da presença dos ácidos nucleicos virais pelas células humanas. Entre os dois principais sensores celulares para detecção do RNA viral estão os “*Toll-like receptors*” (TLR) e o “*Retinoic Inducible Gene-I*” (RIG-I) (12). Os TLRs são responsáveis pela detecção do material genético viral no endossomo. Para detecção dos vírus influenza o TLR3 e o TLR7/8 são particularmente

---

importantes (15, 16). O RIG-I e outros dois membros da mesma família chamada RIG-I-like (MDA-5 e LGP2) detectam o RNA viral no citoplasma e são considerados os principais sensores que levam à produção do interferon (17, 18). Embora algumas células sejam especializadas em fagocitar e detectar antígenos virais, como macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, as principais células indutoras de interferon são as próprias células epiteliais infectadas (12). O interferon tipo I liga-se aos receptores IFNAR, o que ativa a via sinalizadora JAK-STAT e induz a estimulação transcripcional dos “Interferon Stimulated Genes” (ISG), que por sua vez inibem a replicação viral. Existem centenas de genes induzidos pelo interferon, sendo os mais caracterizados os IFITMs, Mx, OAS, ISG15 e PKR, entre outros (12, 19).

Alguns fatores virais podem auxiliar o vírus influenza a restringir a resposta imune inata. A codificação da proteína não estrutural tipo 1 (NS1) ajuda a evitar o reconhecimento pelos TLRs e RIG-I, além de inibir etapas posteriores como a expressão dos ISGs, possuindo um papel central no antagonismo ao interferon (20). Mutações nos genes virais codificadores de NS1 podem, conseqüentemente, aumentar ou atenuar a virulência da cepa (21). Outras proteínas virais como PB1-F2, PB2 e M2 também têm sido associadas à inibição da produção do interferon (22-24).

O conhecimento a respeito da patogênese do vírus influenza B ainda é mais limitado, apesar de estimar-se que a resposta imune inata seja semelhante em linhas gerais (12, 13). Entretanto, há evidências de que o vírus influenza B induza a produção de interferon mais precocemente ao entrar na célula e de maior intensidade, provavelmente por menor evolução adaptativa (25-27). A proteína NS1 desse vírus também não inibe a expressão gênica geral, tendo ligação mais específica pelo ISG15, o que pode explicar o seu mais restrito número de hospedeiros (12, 28).

Embora numerosas evidências experimentais fundamentem os conceitos descritos, estudos em seres humanos ainda são incipientes, quase todos abordando a infecção pelo vírus influenza A (13). Alguns autores relacionam maior intensidade da resposta imune inata à gravidade da infecção por influenza em crianças. Entretanto, este achado não é consistente (29, 30). A maioria das evidências em humanos aponta para a produção deficiente de interferon como fator de risco para maior gravidade da infecção. Duas recentes meta-análises, incluindo estudos em pacientes asiáticos e europeus, associaram a gravidade da infecção por influenza A a presença de polimorfismos do gene

---

IFITM3 (SNP rs12252-C) e a consequente resposta inata ineficiente (31, 32). Estudos em linfócitos e monócitos de sangue periférico de gestantes e de idosos sugerem que os níveis de interferon do tipo I sejam produzidos em menores quantidades nesses indivíduos, podendo contribuir para maior gravidade nesses grupos (33, 34). Em virtude da função autócrina e parácrina do interferon, os níveis respiratórios tendem a ser mais alterados no sítio infeccioso, embora os níveis na via aérea inferior e superior possam não ter correlação direta. Existem achados indicando de que os níveis séricos não se correlacionam com os níveis respiratórios em humanos (29). Há evidência de que lactentes amamentados com leite materno tenham maiores níveis de interferon nas secreções de trato respiratório superior em estudo realizado pelo Centro Infantil de Buenos Aires (35). Em outro estudo ainda não publicado realizado pelo mesmo grupo, o interferon também foi dosado em secreções nasais de 61 crianças com idade inferior a 1 ano. O estudo evidenciou níveis significativamente menores de interferon  $\alpha$  e  $\gamma$  em crianças com influenza A(H1N1)pdm09 e insuficiência respiratória comparadas com crianças sem necessidade de oxigenioterapia.

#### 1.1.4 Quadro clínico

Os sintomas normalmente causados pelo vírus influenza incluem febre, tosse, coriza, obstrução nasal, dor de garganta, cefaleia, mialgia e sintomas gastrointestinais como diarreia, dor abdominal e vômitos, a chamada SG ou “Influenza-like illness” (36, 37). No entanto, estima-se que uma proporção importante de pacientes apresente infecção assintomática ou oligossintomática (38). O vírus influenza caracteriza-se por causar complicações em diversos órgãos e sistemas, sendo as complicações respiratórias as mais prevalentes e temidas. O vírus influenza pode causar insuficiência respiratória por pneumonia viral ou por pneumonia bacteriana secundária (39).

Contudo, é importante ressaltar que todos os sinais e sintomas descritos acima tem especificidade limitada para diagnóstico diferencial entre os diversos subtipos de influenza. Em estudos realizados comparando os subtipos de influenza em pacientes

---

pediátricos, os sinais e os sintomas não são úteis para a diferenciação entre os agentes (39-41).

Há evidências de que o quadro clínico também não auxilia a diferenciação entre o influenza e outros vírus respiratórios em adultos e crianças investigados com *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) (42, 43). Autores que compararam o percentual de pacientes com síndrome classificada como “*Influenza-like*” com pacientes que não se enquadravam na síndrome não encontraram diferença estatisticamente significativa para nenhum dos vírus testados (44). Em outro estudo, 15,9% dos pacientes com 0-2 anos de idade definidos clinicamente como caso suspeito de infecção pelo novo subtipo de influenza estavam infectados por rinovírus (45).

Os exames laboratoriais, como alterações no hemograma, também possuem utilidade limitada para o diagnóstico diferencial. A linfopenia foi descrita como marcador de infecção por influenza A(H1N1)pdm09 em crianças com diagnóstico confirmado comparados com grupo de sintomas semelhantes, mas com RT-PCR negativo para o novo vírus. Entretanto, este achado não tem valor prognóstico (46).

#### 1.1.5 Testes diagnósticos

O teste RT-PCR em secreções respiratórias é o exame laboratorial de maior acurácia para o diagnóstico do vírus influenza utilizado na prática clínica. Em estudo comparando múltiplos testes diagnósticos no início da pandemia de influenza A(H1N1)pdm09 em Nova Iorque, Estados Unidos da América, a sensibilidade, a especificidade, os valores preditivos positivo e negativo do RT-PCR em secreções respiratórias foram, respectivamente, 97,8%, 100%, 100% e 97,3% (47). Entretanto, esse teste não está amplamente disponível na maioria das ocasiões para o médico que presta atendimento a pacientes agudos. Mesmo nos locais onde há disponibilidade, o resultado geralmente não é liberado no mesmo dia da coleta.

O exame diagnóstico mais disponível nos hospitais brasileiros é a Imunofluorescência Direta (IFD) em secreções respiratórias. As maiores limitações deste teste são a impossibilidade de diferenciação dos subtipos de influenza A ou B e,

---

principalmente, a falta de sensibilidade, cujo percentual nos estudos situa-se entre 50-75% (47, 48). É importante ressaltar que a IFD também tem limitações em relação aos demais vírus, apresentando sensibilidade maior que 90% apenas para os vírus sincicial respiratório e parainfluenza 3, alcançando desempenho em torno de 70% para os demais (48). Outro fator que, associado à falta de sensibilidade do teste, dificulta o manejo clínico das infecções por influenza é a prevalência nada desprezível de coinfeções virais, chegou a quase 20% em alguns estudos na população pediátrica hospitalizada durante a pandemia de influenza A(H1N1) em 2009 (49). Portanto, o resultado positivo para outro agente viral na IFD não descarta a coinfeção com influenza, assim como o resultado positivo para influenza A não descarta a presença de outra infecção viral associada.

Outra ferramenta que tem o desempenho muito estudado para detecção do vírus influenza nos últimos anos são os testes rápidos por método imunocromatográfico em secreções respiratórias, cujo resultado é obtido em 15 a 30 minutos. Em meta-análise realizada analisando 159 estudos com 26 tipos diferentes de testes rápidos, sendo mais de 30% destes estudos com influenza, a principal limitação desses testes foi a falta de sensibilidade, cerca de 60%, sendo discretamente maior – cerca de 65% - em pacientes pediátricos e em infecções por influenza A (50).

#### 1.1.6 Fatores prognósticos

Muitos estudos investigaram fatores de risco para evolução desfavorável na infecção por influenza em crianças. Entre os fatores associados a um pior prognóstico, a presença de doenças crônicas é um achado comum à maioria dos levantamentos, com especial destaque ao retardo de desenvolvimento neuropsicomotor, pneumopatias e cardiopatias crônicas, que em algumas casuísticas são fatores de risco mesmo se incluídos nos modelos multivariáveis separadamente das outras doenças crônicas (49, 51-55). Em estudo retrospectivo realizado em Porto Alegre para avaliar os fatores de risco para gravidade da infecção por influenza A(H1N1)pdm09 durante a pandemia de 2009, a presença de comorbidades e a detecção de dois ou mais vírus simultaneamente foram

---

## *Introdução*

---

associada a maior risco de necessidade de ventilação mecânica. Além disso, 10 entre os 11 óbitos ocorreram em crianças com comorbidades (56).

Outros fatores já foram relacionados ao pior desfecho na infecção por influenza, porém não associados de forma tão consistente. Embora a idade inferior a 2 anos seja associada a maior risco de hospitalização, alguns autores encontraram a idade maior associada a um pior desfecho durante a pandemia de 2009. Este achado pode ser associado ao comportamento inicial de uma pandemia com um grande número de suscetíveis que em exposições subsequentes ao mesmo agente já estariam imunizados, deslocando o maior número de pacientes suscetíveis para as faixas etárias menores (57, 58).

O papel da infecção simultânea ou sequencial por dois ou mais agentes virais em relação à gravidade do quadro clínico pelo vírus influenza ainda não é bem compreendido. A presença de co-deteção viral também foi descrita como fator associado a piores desfechos (56, 59). Entretanto, uma meta-análise realizada recentemente não encontrou uma associação da co-deteção de vírus respiratório com maior gravidade (60).

Apesar de serem classicamente associadas a complicações das infecções pelo vírus influenza, as infecções bacterianas do trato respiratório inferior não são associadas à evolução clínica desfavorável em pacientes pediátricos de forma consistente (61-63). A dificuldade inerente na confirmação do diagnóstico etiológico das infecções bacterianas pulmonares na prática clínica contribui para o desafio em esclarecer o papel prognóstico destas (64, 65).

Uso precoce do oseltamivir foi descrito como um possível fator protetor para o óbito na infecção por influenza (66, 67). A meta-análise que incluiu apenas estudos randomizados e controlados por placebo sobre a eficácia dos inibidores de neuraminidase em infecções por influenza em crianças evidenciou que o seu uso reduz a duração da doença em 36 horas. Também é associado à redução do risco de otite média aguda se iniciado nas primeiras 12 horas. Entretanto, não foram encontradas evidências que confirmem a eficácia dos inibidores de neuraminidase na redução de complicações respiratórias, como pneumonia viral e óbito. O uso de oseltamivir foi significativamente associado à presença de vômitos, com número necessário de pacientes tratados para causar dano de 17,9 (IC95% 10 a 34). O zanamivir não foi associado a nenhum evento adverso em maior proporção que o placebo (68). Cabe ressaltar que, em virtude do óbito por influenza ser um desfecho infrequente, o número necessário de pacientes para

---

## *Introdução*

---

avaliação dessa medicação pode ser uma importante limitação dos estudos. Posteriormente, foi publicada outra meta-análise baseada principalmente em dados individuais sobre o tema e incluindo também estudos observacionais com mais de nove mil participantes, que não identificou redução da mortalidade com o uso dos inibidores de neuraminidase em crianças (69). Outra meta-análise com características semelhantes, realizada pelo mesmo grupo avaliando a redução do risco de pneumonia com o uso dos inibidores de neuraminidase, apresentou resultados inconsistentes quanto ao benefício destes (70). Uma limitação adicional do uso de antivirais é a possibilidade do surgimento de resistência do vírus influenza. Com base no fato de que a cepa de influenza A(H1N1) que circulava antes de 2009, o chamado influenza A(H1N1) sazonal, adquiriu resistência aos inibidores de neuraminidase e se disseminou mundialmente com rapidez, estima-se que o aumento da prevalência de mutantes resistentes pode ser uma consequência indesejada do seu uso excessivo. Contudo esta relação entre o surgimento de resistência devido ao uso em larga escala é ainda controversa (71-73).

---

## 1.2 JUSTIFICATIVA

O vírus Influenza persiste sendo importante problema de saúde pública. Além do grande desafio que representa para os gestores da saúde, ocasiona uma situação de difícil manejo para o médico que presta atendimento a pacientes agudos. A dificuldade inerente à diferenciação clínica com outros agentes etiológicos, a falta de acurácia da maior parte dos exames complementares diagnósticos, além da existência de poucos fatores prognósticos bem estabelecidos, acaba acarretando imprecisão nas intervenções preventivas e terapêuticas. A não identificação precoce dos pacientes que evoluirão com complicações ocasiona a instituição tardia do uso de antivirais e de medidas de suporte como internação hospitalar e suporte ventilatório. Por outro lado, o uso de antivirais para um grande número de indivíduos pode aumentar o risco de resistência viral, expor desnecessariamente os pacientes a eventos adversos e acarretar maiores gastos aos cofres públicos. Devido a esta conjunção de situações, a busca de fatores associados a complicações da infecção por influenza, assim como a possibilidade de novas opções terapêuticas persistem sendo importante questão de pesquisa.

Em virtude do panorama descrito, inúmeros estudos têm buscado descobrir novos marcadores, inclusive marcadores biológicos, para auxiliar no manejo da infecção por influenza. Apesar do avanço do conhecimento a respeito dos mecanismos da ação antiviral do interferon, ainda há poucos estudos que avaliaram sua detecção e quantificação em secreções respiratórias como possível marcador prognóstico e seu potencial uso terapêutico em humanos.

Existe a hipótese de que, ao menos em parte, a evolução para insuficiência respiratória seria consequência de uma resposta imune inata ineficiente, que poderia ter correlação com baixos níveis de interferon. Caso esses achados venham a ser confirmados na população pediátrica, poderão proporcionar o desenvolvimento de um teste com elevado valor preditivo negativo para complicações respiratórias, além de potencial desenvolvimento de terapia com interferon para crianças com influenza.

---

### 1.3 OBJETIVO

Avaliar a relação entre o nível de interferon em secreções respiratórias e a gravidade da infecção por influenza.

---

## 1.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Uyeki TM. Influenza viruses. Feigin and Cherry's Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Seventh Edition. Elsevier Saunders. 2014. 2326-59.
  2. Kuszewski K, Brydak L. The epidemiology and history of influenza. Biomed Pharmacother. 2000;54(4):188-95.
  3. Webby RJ, Webster RG. Are we ready for pandemic influenza? Science. 2003;302(5650):1519-22.
  4. Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, et al. Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic drift. Nature. 2015;523(7559):217-20.
  5. Appiah GD, Blanton L, D'Mello T, Kniss K, Smith S, Mustaquim D, et al. Influenza activity - United States, 2014-15 season and composition of the 2015-16 influenza vaccine. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2015;64(21):583-90.
  6. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA, et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. Lancet. 2011;378(9807):1917-30.
  7. Bhat N, Wright JG, Broder KR, Murray EL, Greenberg ME, Glover MJ, et al. Influenza-associated deaths among children in the United States, 2003-2004. N Engl J Med. 2005;353(24):2559-67.
  8. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2015. In: Secretaria de Vigilância em Saúde, editor. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/marco/04/Boletim-Epidemiol--gico-Influenza-SE52-2015-completo.pdf>; Ministério da Saúde; 2016. p. 10.
  9. Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 25 de 2016. In: Secretaria de Vigilância em Saúde, editor. <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/06/informe-epidemiologico-influenza-se25-2016.pdf>; Ministério da Saúde; 2016. p. 10.
  10. Rio Grande do Sul, Secretaria Estadual de Saúde. Boletim semanal de Vigilância da Influenza/RS – 2015. In: Centro Estadual de Vigilância em Saúde, editor. [http://www.saude.rs.gov.br/upload/1459452399\\_Boletim%20semanal%20vigilancia%20da%20Influenza\\_se52\\_2015.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1459452399_Boletim%20semanal%20vigilancia%20da%20Influenza_se52_2015.pdf); Governo do Estado do Rio Grande do Sul; 2016. p. 6.
-

*Referências Bibliográficas*

---

11. Rio Grande do Sul, Secretaria Estadual de Saúde. Boletim semanal de Vigilância da Influenza/RS – Semana epidemiológica 28/2016. In: Centro Estadual de Vigilância em Saúde, editor.  
[http://www.saude.rs.gov.br/upload/1468586712\\_Boletim%20semanal%20vigilancia%20da%20Influenza\\_se28\\_2016.pdf](http://www.saude.rs.gov.br/upload/1468586712_Boletim%20semanal%20vigilancia%20da%20Influenza_se28_2016.pdf): Governo do Estado do Rio Grande do Sul; 2016. p. 10.
  12. Garcia-Sastre A. Induction and evasion of type I interferon responses by influenza viruses. *Virus Res.* 2011;162(1-2):12-8.
  13. Coates BM, Staricha KL, Wiese KM, Ridge KM. Influenza A Virus Infection, Innate Immunity, and Childhood. *JAMA Pediatr.* 2015;169(10):956-63.
  14. Mordstein M, Kochs G, Dumoutier L, Renauld JC, Paludan SR, Klucher K, et al. Interferon-lambda contributes to innate immunity of mice against influenza A virus but not against hepatotropic viruses. *PLoS Pathog.* 2008;4(9):e1000151.
  15. Lund JM, Alexopoulou L, Sato A, Karow M, Adams NC, Gale NW, et al. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(15):5598-603.
  16. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, et al. Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol.* 2007;178(6):3368-72.
  17. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat Immunol.* 2004;5(7):730-7.
  18. Kato H, Takeuchi O, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Matsui K, et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature.* 2006;441(7089):101-5.
  19. Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(26):15623-8.
  20. Liu J, Lynch PA, Chien CY, Montelione GT, Krug RM, Berman HM. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. *Nat Struct Biol.* 1997;4(11):896-9.
  21. Das K, Ma LC, Xiao R, Radvansky B, Aramini J, Zhao L, et al. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(35):13093-8.
  22. Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, et al. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* 2001;7(12):1306-12.
-

*Referências Bibliográficas*

---

23. Carr SM, Carnero E, Garcia-Sastre A, Brownlee GG, Fodor E. Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. *Virology*. 2006;344(2):492-508.
  24. Gannage M, Dormann D, Albrecht R, Dengjel J, Torossi T, Ramer PC, et al. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes. *Cell Host Microbe*. 2009;6(4):367-80.
  25. Osterlund P, Strengell M, Sarin LP, Poranen MM, Fagerlund R, Melen K, et al. Incoming influenza A virus evades early host recognition, while influenza B virus induces interferon expression directly upon entry. *J Virol*. 2012;86(20):11183-93.
  26. Makela SM, Osterlund P, Westenius V, Latvala S, Diamond MS, Gale M, Jr., et al. RIG-I Signaling Is Essential for Influenza B Virus-Induced Rapid Interferon Gene Expression. *J Virol*. 2015;89(23):12014-25.
  27. Jiang J, Li J, Fan W, Zheng W, Yu M, Chen C, et al. Robust Lys63-Linked Ubiquitination of RIG-I Promotes Cytokine Eruption in Early Influenza B Virus Infection. *J Virol*. 2016;90(14):6263-75.
  28. Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. *EMBO J*. 2001;20(3):362-71.
  29. Oshansky CM, Gartland AJ, Wong SS, Jeevan T, Wang D, Roddam PL, et al. Mucosal immune responses predict clinical outcomes during influenza infection independently of age and viral load. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189(4):449-62.
  30. Kim YH, Kim JE, Hyun MC. Cytokine response in pediatric patients with pandemic influenza H1N1 2009 virus infection and pneumonia: comparison with pediatric pneumonia without H1N1 2009 infection. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46(12):1233-9.
  31. Yang X, Tan B, Zhou X, Xue J, Zhang X, Wang P, et al. Interferon-Inducible Transmembrane Protein 3 Genetic Variant rs12252 and Influenza Susceptibility and Severity: A Meta-Analysis. *PloS One*. 2015;10(5):e0124985.
  32. Xuan Y, Wang LN, Li W, Zi HR, Guo Y, Yan WJ, et al. IFITM3 rs12252 T>C polymorphism is associated with the risk of severe influenza: a meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2015;143(14):2975-84.
  33. Forbes RL, Wark PA, Murphy VE, Gibson PG. Pregnant women have attenuated innate interferon responses to 2009 pandemic influenza A virus subtype H1N1. *J Infect Dis*. 2012;206(5):646-53.
  34. Canaday DH, Amponsah NA, Jones L, Tisch DJ, Hornick TR, Ramachandra L. Influenza-induced production of interferon-alpha is defective in geriatric individuals. *J Clin Immunol*. 2010;30(3):373-83.
-

*Referências Bibliográficas*

---

35. Melendi GA, Coviello S, Bhat N, Zea-Hernandez J, Ferolla FM, Polack FP. Breastfeeding is associated with the production of type I interferon in infants infected with influenza virus. *Acta Paediatr.* 2010;99(10):1517-21.
  36. Hackett S, Hill L, Patel J, Ratnaraja N, Ifeyinwa A, Farooqi M, et al. Clinical characteristics of paediatric H1N1 admissions in Birmingham, UK. *Lancet.* 2009;374(9690):605.
  37. Eccles R. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *The Lancet Infect Dis.* 2005;5(11):718-25.
  38. Miller E, Hoschler K, Hardelid P, Stanford E, Andrews N, Zambon M. Incidence of 2009 pandemic influenza A H1N1 infection in England: a cross-sectional serological study. *Lancet.* 2010;375(9720):1100-8.
  39. Morgan CI, Hobson MJ, Seger B, Rice MA, Staat MA, Wheeler DS. 2009 pandemic influenza A (H1N1) in critically ill children in Cincinnati, Ohio. *Pediatr Crit Care Med.* 2012;13(3):e140-4.
  40. Ostovar GA, Rubin LG, Rajan S, Sood SK, Kohn N. Comparison of the clinical features of children hospitalized with pandemic 2009 A:H1N1 and seasonal influenza. *Clin Pediatr (Phila).* 2011;50(4):348-54.
  41. Stripeli F, Logotheti I, Vraila VM, Balta C, Patsioura A, Papaevangelou V, et al. Pandemic influenza A vs seasonal influenza A in hospitalized children in Athens. *Paediatr Int Child Health.* 2015;35(1):61-4.
  42. Watanabe AS, Carraro E, Moreira L, Camargo C, Sinohara J, Puerari D, et al. Respiratory virus infections among hospitalized patients with suspected influenza A H1N1 2009 virus during the first pandemic wave in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(3):220-4.
  43. Schnepf N, Resche-Rigon M, Chaillon A, Scemla A, Gras G, Semoun O, et al. High burden of non-influenza viruses in influenza-like illness in the early weeks of H1N1v epidemic in France. *PloS One.* 2011;6(8):e23514.
  44. Thiberville SD, Ninove L, Vu Hai V, Botelho-Nevers E, Gazin C, Thirion L, et al. The viral etiology of an influenza-like illness during the 2009 pandemic. *J Med Virol.* 2012;84(7):1071-9.
  45. de Ona Navarro M, Melon Garcia S, Alvarez-Arguelles M, Fernandez-Verdugo A, Boga Riveiro JA. Infection by rhinovirus: similarity of clinical signs included in the case definition of influenza IAn/H1N1. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2012;30(7):367-70.
  46. Chiappini E, Galli L, Azzi A, Resti M, Bonsignori F, de Martino M. Lymphocytopenia as a marker for pandemic influenza A/H1N1 2009 virus infection in children. *J Med Virol.* 2011;83(1):1-4.
-

*Referências Bibliográficas*

---

47. Ginocchio CC, Zhang F, Manji R, Arora S, Bornfreund M, Falk L, et al. Evaluation of multiple test methods for the detection of the novel 2009 influenza A (H1N1) during the New York City outbreak. *J Clin Virol*. 2009;45(3):191-5.
  48. Gharabaghi F, Hawan A, Drews SJ, Richardson SE. Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(12):1900-6.
  49. Libster R, Bugna J, Coviello S, Hijano DR, Dunaiewsky M, Reynoso N, et al. Pediatric hospitalizations associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Argentina. *N Engl J Med*. 2010;362(1):45-55.
  50. Chartrand C, Leeftang MM, Minion J, Brewer T, Pai M. Accuracy of rapid influenza diagnostic tests: a meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012;156(7):500-11.
  51. O'Riordan S, Barton M, Yau Y, Read SE, Allen U, Tran D. Risk factors and outcomes among children admitted to hospital with pandemic H1N1 influenza. *CMAJ*. 2010;182(1):39-44.
  52. Gentile A, Bakir J, Russ C, Ruvinsky S, Ensinck G, Falaschi A, et al. [Study of respiratory influenza A H1N1 Virus (pH1N1) in hospitalized children in the pandemic year. Experience in 34 centers in Argentina]. *Arch Argent Pediatr*. 2011;109(3):198-203.
  53. Keren R, Zaoutis TE, Bridges CB, Herrera G, Watson BM, Wheeler AB, et al. Neurological and neuromuscular disease as a risk factor for respiratory failure in children hospitalized with influenza infection. *JAMA*. 2005;294(17):2188-94.
  54. Koh MT, Eg KP, Loh SS. Hospitalised Malaysian children with pandemic (H1N1) 2009 influenza: clinical characteristics, risk factors for severe disease and comparison with the 2002-2007 seasonal influenza. *Singapore Med J*. 2016;57(2):81-6.
  55. Chong CY, Tan NW, Menon A, Thoon KC, Tee NW, Fu S. Risk Factors for Complicated Influenza A (H1N1) 2009 Disease in Children. *Ann Acad Med Singapore*. 2013;42(5):232-6.
  56. Scotta MC, Mattiello R, Marostica PJ, Jones MH, Martins LG, Fischer GB. Risk factors for need of mechanical ventilation in children with influenza A(H1N1)pdm09. *J Pediatr (Rio J)*. 2013;89(5):444-9.
  57. Cox CM, Blanton L, Dhara R, Brammer L, Finelli L. 2009 Pandemic influenza A (H1N1) deaths among children--United States, 2009-2010. *Clin Infect Dis*. 2011;52 Suppl 1:S69-74.
  58. Quach C, Piche-Walker L, Platt R, Moore D. Risk factors associated with severe influenza infections in childhood: implication for vaccine strategy. *Pediatrics*. 2003;112(3 Pt 1):e197-201.
-

*Referências Bibliográficas*

---

59. Torres SF, Iolster T, Schnitzler EJ, Farias JA, Bordogna AC, Rufach D, et al. High mortality in patients with influenza A pH1N1 2009 admitted to a pediatric intensive care unit: a predictive model of mortality. *Pediatr Crit Care Med*. 2012;13(2):e78-83.
  60. Scotta MC, Chakr VC, de Moura A, Becker RG, de Souza AP, Jones MH, et al. Respiratory viral coinfection and disease severity in children: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol*. 2016;80:45-56.
  61. Blyth CC, Webb SA, Kok J, Dwyer DE, van Hal SJ, Foo H, et al. The impact of bacterial and viral co-infection in severe influenza. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7(2):168-76.
  62. Hernandez-Bou S, Novell CB, Alins JG, Garcia-Garcia JJ, Infectious Diseases Working Group SSoPE. Hospitalized children with influenza A H1N1 (2009) infection: a Spanish multicenter study. *Pediatr Emerg Care*. 2013;29(1):49-52.
  63. Randolph AG, Vaughn F, Sullivan R, Rubinson L, Thompson BT, Yoon G, et al. Critically ill children during the 2009-2010 influenza pandemic in the United States. *Pediatrics*. 2011;128(6):e1450-8.
  64. Hammitt LL, Murdoch DR, Scott JA, Driscoll A, Karron RA, Levine OS, et al. Specimen collection for the diagnosis of pediatric pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2012;54 Suppl 2:S132-9.
  65. Rambaud-Althaus C, Althaus F, Genton B, D'Acremont V. Clinical features for diagnosis of pneumonia in children younger than 5 years: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2015;15(4):439-50.
  66. Farias JA, Fernandez A, Monteverde E, Vidal N, Arias P, Montes MJ, et al. Critically ill infants and children with influenza A (H1N1) in pediatric intensive care units in Argentina. *Intensive Care Med*. 2010;36(6):1015-22.
  67. Muhammad Ismail HI, Tan KK, Lee YL, Pau WS, Razali KA, Mohamed T, et al. Characteristics of children hospitalized for pandemic (H1N1) 2009, Malaysia. *Emerg Infect Dis*. 2011;17(4):708-10.
  68. Wang K, Shun-Shin M, Gill P, Perera R, Harnden A. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in children (published trials only). *Cochrane Database Syst Rev*. 2012(4):CD002744.
  69. Muthuri SG, Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Al Khuwaitir TS, Al Mamun A, et al. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: a meta-analysis of individual participant data. *Lancet Respir Med*. 2014;2(5):395-404.
  70. Muthuri SG, Venkatesan S, Myles PR, Leonardi-Bee J, Lim WS, Al Mamun A, et al. Impact of neuraminidase inhibitors on influenza A(H1N1)pdm09-related
-

*Referências Bibliográficas*

---

- pneumonia: an individual participant data meta-analysis. *Influenza Other Respir Viruses*. 2016;10(3):192-204.
71. Takashita E, Meijer A, Lackenby A, Gubareva L, Rebelo-de-Andrade H, Besselaar T, et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2013-2014. *Antiviral Res*. 2015;117:27-38.
72. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van-der-Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-resistant influenza virus A (H1N1), Europe, 2007-08 season. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):552-60.
73. Hurt AC, Ernest J, Deng YM, Iannello P, Besselaar TG, Birch C, et al. Emergence and spread of oseltamivir-resistant A(H1N1) influenza viruses in Oceania, South East Asia and South Africa. *Antiviral Res*. 2009;83(1):90-3.
-