

ANÁLISE DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DA NEURAMINIDASE DOS VÍRUS INFLUENZA A H1N1pdm09 CIRCULANTES NO RIO GRANDE DO SUL ENTRE 2009 E 2012

Silvia De Carli¹

Fernanda Kieling Moreira Lehmann²

Camila Marx³

Alessandra Caroline Borchardt³

Vagner Ricardo Lunge⁴

Nilo Ikuta⁵

RESUMO

A mais recente pandemia de gripe humana foi causada pelo vírus influenza A H1N1 pdm09, sendo confirmados mais de quatro mil casos no Rio Grande do Sul (RS). O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade da proteína Neuraminidase (NA) dos vírus A H1N1pdm09 circulantes no RS de 2009 a 2012. Foram analisadas 365 amostras de pacientes com A H1N1pdm09 e Síndrome Respiratória Aguda Grave. Os resultados mostraram alto grau de identidade viral (97,1% e 100%), mas com alterações pontuais de aminoácidos (como V81A, S95N, V106I, T157A, I193V, I188T, I241V e C285S) em número significativo de amostras na comparação com a vacina A/Califórnia/07/2009. Além disso, quatro amostras apresentaram modificações (H275Y, S247N) de resistência ao medicamento utilizado (oseltamivir).

Palavras-chave: Vírus influenza, A H1N1 pdm09, mutações, neuraminidase, oseltamivir.

ABSTRACT

The most recent human influenza pandemic was caused by influenza A H1N1pdm09 with more than four thousand cases in Rio Grande do Sul State (RS). The aim of this study was to analyze the diversity of Neuraminidase (NA) gene and protein of the influenza virus A H1N1pdm09 circulating in RS from 2009 to 2012. A total of 365 samples from patients with A H1N1pdm09 and Severe Acute Respiratory Disease were collected and analyzed by polymerase chain reaction and sequencing. The results demonstrated a high viral identity (97.1% and 100%), but with some specific amino acid changes (such as V81A, S95N, V106I, T157A, I193V, I188T, I241V and C285S) in a significant number of samples when compared to the vaccine A/California/07/2009. In addition, four samples showed amino acids modifications (H275Y, S247N) associated to oseltamivir viral resistance.

Keywords: Influenza virus, A H1N1pdm09, mutations, neuraminidase, oseltamivir.

¹ Acadêmica do curso de Medicina Veterinária/ULBRA – Bolsista PROBIC/FAPERGS

² Laboratório de Diagnóstico Molecular/ULBRA

³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular aplicada à Saúde/ULBRA

⁴ Professor do curso de Medicina Veterinária e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular aplicada à Saúde/ULBRA

⁵ Professor - Orientador do curso de Medicina Veterinária e Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular aplicada à Saúde/ULBRA (Ikuta@ulbra.br)

INTRODUÇÃO

A gripe é uma doença infecciosa aguda de aves e mamíferos, incluindo o homem. O agente etiológico é o vírus influenza que pertence à família *Orthomyxoviridae* (ATMAR, 2007). Este vírus é classificado em três tipos principais (A, B e C), sendo que o tipo A é o único que possui subtipos e o principal causador das gripes humanas (HAYDEN; PALESE, 2009).

O vírus influenza apresenta evolução rápida devido à ampla gama de hospedeiros, altas taxas de mutação e rápida replicação (SMITH et al., 2009; HOLMES, 2010). Consequentemente também apresenta uma elevada propensão para escapar da resposta imune do hospedeiro, devido às variações antigênicas das proteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) decorrentes das mutações no genoma viral. Atualmente são conhecidas dezesseis variantes antigênicas de HA (identificadas de H1 a H16) e nove de NA (identificadas de N1 a N9) que ocorrem em variadas combinações e infectam os mais diversos animais. Esta diversidade de tipos e subtipos facilita a ocorrência de pandemias, normalmente relacionadas a novos subtipos do tipo A, ou mesmo epidemias anuais recorrentes, causadas por subtipos que já estão a mais tempo circulando e que são ditos sazonais (FERGUSON et al., 2003).

A mais recente pandemia de vírus influenza humana foi do tipo A subtipo H1N1 e que se iniciou em março de 2009, sendo denominada A H1N1pdm09. No primeiro ano da pandemia foram confirmados 27.850 casos no Brasil, sendo 3.585 no Rio Grande do Sul (RS) (com 298 óbitos). Em 2010 houve uma grande redução da circulação do vírus influenza A H1N1pdm09 no mundo todo (inclusive não sendo detectado no RS) e foi declarado o fim da pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS). No entanto, este continuou a circular na população e voltou a ser detectado no RS nos dois anos seguintes, sendo confirmados 108 casos (13 óbitos) em 2011, e 525 casos (67 óbitos) em 2012 (MARX et al., 2013).

A vacinação é uma forma efetiva de prevenção da gripe. Entretanto nem todas as pessoas são imunizadas anualmente e novos casos surgem constantemente (até mesmo em pessoas vacinadas). Nestas situações os antivirais são recomendados para o tratamento da doença. Atualmente estão disponíveis quatro medicamentos: dois de primeira geração (amantadina e rimantadina), que inibem a replicação viral pela inativação proteína M2 (canal iônico), e dois de segunda geração (zanamivir e oseltamivir), que inibem a atividade da NA (BESSELAAR et al., 2008; GARTEN et al., 2009). A principal restrição ao uso dos antivirais é o desenvolvimento de resistência viral após uso prolongado. Durante o período de 2005/2006, a grande maioria dos vírus A H3N2 e 15% dos A H1N1 sazonais apresentava resistência às amantadinas na Ásia e nos Estados Unidos (LAPLANTE et al., 2009; MAURER-STROH et al., 2009). Com relação aos fármacos de segunda geração, o Centro de Controle de Doenças (CDC, *Centers for Disease Control* – Atlanta, Estados Unidos) relatou que mais de 90% dos vírus H3N2 e 4% dos vírus H1N1 sazonais possuíam mutações de resistência até 2006 (MAURER-STROH et al., 2009). Outro estudo demonstrou que cepas sazonais resistentes têm circulado com frequência na Europa (25%), no continente Americano (16%) e nas regiões do Pacífico oeste (4%) (RAMEIX-WELTI et al., 2008). A resistência específica ao oseltamivir envolve uma substituição de aminoácidos bem estabelecida (Histidina para Tirosina) no resíduo 275 da cadeia peptídica da NA. Esta substituição, denominada H275Y, é bastante comum

nos vírus sazonais (RAMEIX-WELTI et al., 2008; MAURER-STROH et al., 2009). O vírus A H1N1pdm09 normalmente não apresenta esta alteração e é, portanto, suscetível ao oseltamivir, que passou a ser o medicamento de escolha para o tratamento de casos mais graves. Entretanto diversos casos pontuais de resistência já foram registrados na atual pandemia, inclusive no RS (WHO², 2011; MARX et al., 2013).

O objetivo deste estudo foi analisar a variação na sequência de aminoácidos da NA dos vírus A H1N1pdm09 que circularam no RS nos anos de 2009 a 2012. Adicionalmente foi investigada a ocorrência de casos de resistência viral associados aos inibidores da NA, principalmente o oseltamivir.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

As amostras clínicas (aspirado de nasofaringe ou *swab*) foram provenientes de pacientes com sintomas de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) de diferentes cidades do RS nos anos de 2009 a 2012. Todas as amostras haviam sido previamente analisadas e confirmadas para a presença do vírus influenza A H1N1pdm09 pela técnica de PCR em tempo real no Laboratório Central do RS (LACEN - RS). Foram selecionadas 140 amostras do ano de 2009, 105 do ano de 2011 e 120 do ano de 2012, totalizando 365.

Procedimentos laboratoriais

As amostras foram submetidas à extração do RNA pelo método de adsorção em sílica utilizando o kit comercial NewGene (SIMBIOS Biotecnologia, Cachoeirinha, RS, Brasil). A amplificação da região alvo do gene da NA foi realizada pela técnica de *nested* RT-PCR utilizando na primeira reação os *primers* NAF 121 (5'- GGG AAT CAA AAT CAG ATT GAAACA -3') e NAR 970 (5'- CTC CGAAAA TCC CACTGC AT -3') juntamente com os demais reagentes (transcriptase reversa, Taq DNA polimerase, dNTPs e tampão apropriado). O sistema de reação do *nested* PCR foi realizado com os *primers* NAF 203 (5'- CAT CAG CAA CAC CAA CTT TGC -3') e NAR 882 (5'- ATC CCT GCA CAC ACA TGT GAT T -3') e também os demais reagentes (Taq DNA polimerase, dNTPs e tampão apropriado). As condições de amplificação da RT-PCR foram: transcrição reversa em 37 °C por 30 min, seguida de desnaturação em 95 °C por 3 min e a primeira PCR com 35 ciclos de 95 °C por 20s, 55 °C por 40s e 72 °C por 60s, extensão final de 72 °C por 5 min. A *nested* PCR foi realizada com uma desnaturação inicial de 95 °C por 3 min seguida de 35 ciclos de 95 °C por 20s, 55 °C por 40s e 72 °C por 60s, e uma extensão final de 72 °C por 5 min. Os *amplicons* (680 pb) foram analisados por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio.

Cada produto da amplificação foi purificado, quantificado e aplicado diretamente em duas reações de sequenciamento independentes usando os dois *primers* internos (NAF 203 e NAR 882) separadamente e o reagente *Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). As condições de

sequenciamento foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 min seguido de 40 ciclos de 95°C por 10s e 60°C por 4min. Os resultados foram avaliados usando o software ABI 3130x / Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos).

Análise das sequências

As duas sequências de nucleotídeos de cada amostra foram reunidas em uma fita única de DNA (consenso) com o uso do programa SeqMan. As sequências consenso de nucleotídeos de cada amostra foram traduzidas para sequências de aminoácidos e alinhadas, juntamente com dados de amostras de referência (principalmente a da cepa original e vacinal A/California/07/2009 H1N1), para análise comparativa e visualização de alterações pontuais de aminoácidos usando o programa MegAlign (Lasergene, DNASTar, Madison, WI, Estados Unidos).

A ocorrência específica da principal alteração de aminoácidos associada à resistência à oseltamivir (H275Y), bem como outras modificações relacionadas (como S79G, V116A, I117M/V, E119V/G/A/D, H126N, D151G/A/N/V, D199G/E, R222Q, I223M/V/R, V234M, S247G/N e H274N) foram analisadas com especial atenção. Alterações associadas com a resistência ao Zanamivir (como E119V/G/A/D, H126N, D151G/A/N/V, D199G/E e G249R e principalmente Q136K) também foram especificamente analisadas (SHEU et al., 2008; DEYDE et al., 2010; JANIES et al., 2010; HURT et al., 2011).

RESULTADOS

Análise das sequências de aminoácidos da NA

A identidade global de aminoácidos entre as sequências de NA dos pacientes do estudo e a da cepa da vacina de referência, A/California/07/2009 (H1N1), variou de 96,7% a 100%. Todas as sequências de NA do estudo, independentemente do ano, diferiram da sequência de NA da cepa vacinal por pelo menos duas mudanças de aminoácidos. A análise dos resíduos de aminoácidos das sequências da NA das amostras do ano de 2009 demonstrou que os vírus apresentaram uma elevada identidade entre si (99,5% a 100%). Em relação à cepa A/Califórnia/07/2009, todas as 140 sequências apresentaram duas alterações (V106I e I241V). Além disso, foram observados oito pacientes com mais modificações: V80M (3), V83M (1), S196T (1), I216V (1), R257K (1) e H275Y (1) (Tabela 1).

Na análise das amostras do ano de 2011, a identidade de aminoácidos foi um pouco abaixo da observada em 2009 (variou entre 97,1% a 100%). Foram observadas 21 alterações pontuais em comparação com a sequência de referência A/Califórnia/07/2009: A76S (1), V81A (16), V83A (1), K84T (1), S95N (39), S101G (1), S101N (1), V106I (104), D142E (1), T157A (30), A181S (1), I193V (39), I195V (1), R220G (1), A232T (1), V234I (1), T240S (1), I241V (7), S247N (1), D248N (2) e S266T (1). Diferentemente do ano de 2009, a mutação V106I não foi observadas em todas as amostras (ocorreu em 104 das 105) e principalmente a alteração I241V não apareceu de forma significativa (foram observados apenas sete casos) (Tabela 1).

No ano de 2012 verificou-se que as sequências da NA apresentaram 98,1% a 100% de identidade entre si. Na comparação com a cepa A/Califórnia/07/2009 constataram-se 25 diferentes alterações de aminoácidos: V81A (1), S82P (3), A86T (3), S101N (1), S105R (1), V106I (120), P126L (1), P154S (1), S182C (1), I188T (22), I212M (1), T215S (1), T240S (1), M242I (1), D244E (1), S252A (1), F256L (2), R257I (1), I258F (1), E259K (2), V264I (1), N270K (2), H275Y (2), C281S (1) e C285S (70). A mutação I241V não voltou ocorrer nas amostras de 2012, porém a mutação V106I disseminou-se em todas as sequências deste ano, reproduzindo o que ocorreu nos anos anteriores (Tabela 1).

Tabela 1. Substituições pontuais de aminoácidos encontradas nas sequências da Neuraminidase (NA) dos vírus A/H1N1/pdm09 que circularam no Estado do Rio Grande do Sul nos anos de 2009 a 2012.

Ano	Número de isolados	Posição da mutação (Total)
2009	140	V80M (3)
		V83M (1)
		V106I (140)
		S196T (1)
		I216V (1)
		I241V (140)
		R257K (1)
		H275Y (1)
		A76S (1)
		V81A (16)
2011	105	V83A (1)
		K84T (1)
		S95N (39)
		S101G (1)
		S101N (1)
		V106I (104)
		D142E (1)
		T157A (30)
		A181S (1)
		I193V (39)
2012	120	I195V (1)
		R220G (1)
		A232T (1)
		V234I (1)
		T240S (1)
		I241V (7)
		S247N (1)
		D248N (2)
		S266T (1)
		V81A (1)
S82P (3)		
A86T (3)		
S101N (1)		
S105R (1)		
V106I (120)		
P126L (1)		
P154S (1)		
S182C (1)		
I188T (22)		
I212M (1)		
T215S (1)		
T240S (1)		
M242I (1)		
D244E (1)		
S252A (1)		
F256L (2)		
R257I (1)		
I258F (1)		
E259K (2)		
V264I (1)		
N270K (2)		
H275Y (2)		
C281S (1)		
C285S (70)		

Análise da resistência aos inibidores de neuraminidase.

Foram identificadas três amostras com a alteração H275Y e uma com S247N. As demais modificações que conferem resistência total ou parcial ao oseltamivir (S79G, V116A, I117M/V, E119V/G/A/D, H126N, D151G/A/N/V, D199G/E, R222Q, I223M/V/R, V234M e H274N) não foram detectadas. Também não foram detectadas alterações de aminoácidos que poderiam conferir resistência ao zanamivir (E119V/G/A/D, H126N, Q136K, D151G/A/N/V, D199G/E e G249R).

Os dois primeiros casos de resistência a oseltamivir foram devido às alterações H275Y e S247N e ocorreram em pacientes infectados nos anos de 2009 e 2011, respectivamente. O primeiro paciente era do sexo masculino, tinha 26 anos de idade, residia em Gravataí, possuía imunodepressão, não havia sido vacinado e veio a óbito um mês após os sintomas iniciais. O segundo paciente era um menino de três meses de idade, residente em Guaíba, tinha Síndrome de Down, fez uso de oseltamivir um dia após o início dos sintomas e também veio a óbito.

Os outros dois casos de resistência foram devido à modificação H275Y e ocorreram em pacientes do sexo masculino que evoluíram para a cura no ano de 2012. O primeiro paciente tinha 28 anos, era residente em Cruz Alta, apresentava problemas cardíacos e respiratórios e fez tratamento com oseltamivir três dias após o início dos sintomas. O segundo caso era um paciente com 34 anos, residente em Alvorada, sem comorbidades, não havia tomado vacina e realizou tratamento com oseltamivir três dias após o início dos sintomas.

DISCUSSÃO

As populações de vírus de influenza circulantes variam geneticamente (e consequentemente antigenicamente) conforme a região geográfica e também com o passar dos anos. A OMS realiza anualmente uma vigilância nas populações humanas de diversos locais do mundo, caracterizando o tipo/subtipo viral, a severidade das respectivas infecções, susceptibilidade aos medicamentos e recomendação de cepas vacinais. Esta avaliação tem se tornado mais sofisticada com a inclusão das análises moleculares, possibilitando a obtenção de informações mais precisas quanto à disseminação e identificação de linhagens virais (ANTÓN et al., 2012).

No presente estudo, a análise das sequências de aminoácidos da NA dos vírus A H1N1pdm09 que circularam no RS durante um período de quatro anos (2009 a 2012) demonstrou uma elevada identidade em cada ano (acima de 97%). Conforme o esperado para a evolução da circulação do vírus na população, a identidade foi maior no primeiro ano em comparação com os demais, refletindo um processo de deriva antigênica com crescente número de alterações de aminoácidos na NA: oito em 2009, 21 em 2011 e 25 em 2012. Resultados similares foram observados em outros estudos, tanto com cepas clássicas sazonais como com o vírus desta última pandemia (BUSH et al., 1999; PIRALLA et al., 2013).

Apesar do índice elevado, foram observadas algumas modificações pontuais, características da maioria (se não todas) amostras analisadas. Duas mudanças de aminoácidos foram fixadas (V106I e I241V) em todas as amostras do primeiro ano da nova epidemia (2009) em relação à cepa original (e vacinal) A/California/07/2009 (H1N1). Nos anos seguintes da epidemia no RS (2011 e 2012), praticamente todas as amostras apresentaram a alteração V106I (a única exceção foi uma amostra de 2011), enquanto que a grande maioria não apresentou a alteração I241V (foram apenas sete em 2011 e nenhuma em 2012). A tendência de todas as amostras que disseminaram mais amplamente apresentar a Isoleucina na posição 106, bem como a predominância de Valina na posição 241 da NA, já tinha sido demonstrada em estudos realizados em outros locais do mundo no período de 2010 a 2012, apesar da divergência em relação às estações do ano (KHANDAKER et al., 2013; PIRALLA et al., 2013; TAKASHITA et al., 2014).

As drogas de segunda geração recomendadas no tratamento e profilaxia da influenza A e B são os inibidores de neuraminidase oseltamivir e zanamivir. Devido à utilização prévia destas medicações, algumas linhagens de vírus resistentes a estas drogas foram selecionadas por pressão de seleção desde 2003 (LEE et al., 2010). A taxa de resistência para os inibidores da NA nos vírus influenza sazonais era bastante baixa (0,5%) (SHEU et al., 2008). Mas a partir de 2008, observou-se o aumento nas frequências de resistência em todos os Continentes (RAMEIX-WELTI et al., 2008). Além disto, verificou-se uma disseminação consistente de vírus resistentes em vários países, mesmo em locais com pouca tradição de uso do oseltamivir. Isto indica a adaptação de uma linhagem viral com capacidade de disseminação tão eficiente quanto às linhagens selvagens (HAUGE et al., 2009; DEYDE et al., 2010).

O cenário acima foi alterado na pandemia de 2009, pois o vírus A H1N1pdm09 apresentou sensibilidade a estes fármacos em um primeiro momento. As terapias baseadas nos inibidores da NA (principalmente oseltamivir) passaram a ser as principais opções de tratamento. Como consequência, linhagens do vírus A H1N1pdm09 oseltamivir resistentes foram detectadas já durante o primeiro ano da pandemia (2009) em países como Japão, Dinamarca e Hong Kong (WHO¹, 2009; CHEN et al., 2009). Até agosto de 2011 haviam sido descritos e caracterizados 570 casos de vírus resistentes a oseltamivir. A mutação mais frequente nestes casos foi à substituição H275Y. A mutação S247N descrita primeiramente em pacientes com imunodepressão começou a ser detectada em pacientes imunocompetentes no primeiro trimestre de 2011 (WHO², 2011).

O presente estudo demonstrou a ocorrência das alterações de resistência (H275Y e S247N) em amostras de pacientes comprovadamente infectados com o vírus influenza A H1N1pdm09 no RS. Apesar da resistência, dois pacientes evoluíram para cura. Estudos recentes demonstram que esta situação clínica não é inesperada, pois o uso de oseltamivir não altera de forma significativa a progressão da doença em cada paciente (JEFFERSON et al., 2014). Mas o fato inequívoco

é que as alterações de resistência corresponderam a frequências crescentes com a evolução da epidemia (0,6% do total de casos em 2009, 0,9% em 2011 e 2,1% em 2012), demonstrando uma tendência à adaptação viral com o uso intensivo da medicação (previamente observado com os tipos sazonais). Novos estudos devem ser realizados para monitoria da disseminação destes vírus resistentes às medicações.

CONCLUSÕES

Ocorreram diversas alterações pontuais nas sequências de aminoácidos dos vírus A H1N1pdm09 que circularam no RS nos anos de 2009 a 2012. Foram observadas duas modificações (H275Y e S247N) que conferem resistência ao oseltamivir (principal fármaco utilizado no tratamento do vírus A H1N1pdm09), mas estas ocorreram em baixa frequência (1,1% do total).

REFERÊNCIAS

- ANTÓN, A. et al. Influenza A (H1N1) pdm 09 virus: viral characteristics and genetic evolution. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 30, Sup. 4, p. 10-17. Oct. 2012.
- ATMAR, R. L.; LINDSTROM, S. E. Influenza viruses. In: VERSALOVIC, J. **Manual of clinical microbiology**. 10th ed. Texas, 2011. p. 1340-1377.
- BESSELAAR, T. G. et al. Widespread oseltamivir resistance in influenza A viruses (H1N1), South Africa. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 11, p. 1809-1810, nov. 2008.
- BUSH, R. M. et al. Predicting the evolution of human influenza A. **Science**, v. 286, n. 5446, p. 1921-1925, dez. 1999.
- CHEN, G. W. et al. Amino acids transitioning of 2009 H1N1pdm in Taiwan from 2009 to 2011. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45946, Sep. 2012.
- DEYDE, V. M. et al. Detection of molecular markers of drug resistance in 2009 pandemic influenza A (H1N1) viruses by pyrosequencing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 1102-1110, mar. 2010.
- FERGUSON, N. M.; GALVANI, A. P.; BUSH, R. M. Ecological and immunological determinants of influenza evolution. **Nature**, v. 422, n. 6930, p. 428-433, mar. 2003.
- GARTEN, R. J. et al. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans. **Science**, v. 325, n. 5937, p. 197-201, jul. 2009.
- HAUGE, S. H. et al. Oseltamivir-resistant influenza viruses A (H1N1), Norway, 2007-08. **Emerg Infect Dis.**, v. 15, n. 2, p. 155-162, feb. 2009.

HAYDEN, F. G.; PALESE, P. Influenza virus. In: RICHMAN, D. D.; WHITLEY, R. J.; HAYDEN, F. G. **Clinical Virology**. 13th ed. Washington, 2009. p. 943-976.

HOLMES, E. C. Virology. Helping the resistance. **Science**, v. 328, n. 5983, p. 1243-1244, jun. 2010.

HURT, A. C. et al. Increased detection in Australia and Singapore of a novel influenza A(H1N1)2009 variant with reduced oseltamivir and zanamivir sensitivity due to a S247N neuraminidase mutation. **Euro Surveill.**, v. 16, n. 23, p. pii: 19884, 2011. (Erratum in: *Euro Surveill.*, v. 16, n. 27, p. pii: 19909, jun. 2011).

JANIES, D. A. et al. Selection for resistance to oseltamivir in seasonal and pandemic H1N1 influenza and widespread co-circulation of the lineages. **Int J Health Geogr.**, v. 24, p. 9-13, feb. 2010.

JEFFERSON, T. et al. Neuraminidase inhibitors for preventing and treating influenza in healthy adults and children. **Cochrane Database Syst Rev.**, v. 10, n. 4, p. CD008965, apr. 2014.

KHANDAKER, I. et al. Molecular evolution of the hemagglutinin and neuraminidase genes of pandemic (H1N1) 2009 influenza viruses in Sendai, Japan, during 2009-2011. **Virus Genes.**, v. 47, p. 456-466, sep. 2013.

LAPLANTE, J. M. et al. Influenza antiviral resistance testing in New York and Wisconsin, 2006 to 2008: methodology and surveillance data. **J Clin Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 1372-1378, may. 2009.

LEE, G. C. et al. Evaluation of a rapid diagnostic test, NanoSign® Influenza A/B Antigen, for detection of the 2009 pandemic influenza A/H1N1 viruses. **Virol J.**, v. 20, n. 7, p. 244, sep. 2010.

MARX, C. et al. Detection of Oseltamivir-Resistant Influenza A H1N1 2009 Virus in Rio Grande do Sul State (Brazil). **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 108, n. 3, may. 2012.

MAURER-STROH, S. et al. Mapping the sequence mutations of the 2009 H1N1 influenza A virus neuraminidase relative to drug and antibody binding sites. **Biol Direct**, v. 20, n. 4, p. 18, may. 2009.

PIRALLA, A. et al. Multiple clusters of A(H1N1)pdm09 virus circulating in severe cases of influenza during the 2010-2011 season: a phylogenetic and molecular analysis of the neuraminidase gene. **J Med Virol.**, v. 85, n. 6, p. 944-952, jun. 2013.

RAMEIX-WELTI, M. A. et al. Enzymatic properties of the neuraminidase of seasonal H1N1 influenza viruses provide insights for the emergence of natural resistance to oseltamivir. **PLoS Pathog.**, v. 25, n. 4, p. 7: e1000103, jul. 2008.

SHEU, T. G. et al. Surveillance for neuraminidase inhibitor resistance among human influenza A and B viruses circulating worldwide from 2004 to 2008.

Antimicrob Agents Chemother, v. 52, n. 9, p. 3284-3292, sep. 2008.

SMITH, G. J. et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 14, v. 106, n. 28, p. 11709-11712, jul. 2009.

TAKASHITA, E. et al. A community cluster of influenza A(H1N1)pdm09 virus exhibiting cross-resistance to oseltamivir and peramivir in Japan, November to December 2013. **Euro Surveill.**, 9, v. 19, n. 1, jan. 2014.

WHO - World Health Organization. **Antiviral use and the risk of drug resistance**. Pandemic (H1N1) 2009 briefing note 12. 25 september 2009. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/swineflu/notes/h1n1_antiviral_use_20090925/en/index.html>. Acesso em: 8 out. 2013.

WHO - World Health Organization. **Update on oseltamivir resistance in Influenza A (H1N1) 2009 viruses**. 2011. Disponível em: <http://www.who.int/Influenza/surveillance_monitoring/updates/2011_08_26_weekly_web_update_oseltamivir_resistance.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2013.