

AVALIAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA DOS CASOS DE INFLUENZA A (H1N1) E O IMPACTO DA VACINAÇÃO EM INDIVÍDUOS QUE RESIDEM EM CURITIBA-PR.

EPIDEMIOLOGIC EVALUATION OF CASES OF INFLUENZA A (H1N1) AND THE IMPACT OF VACCINATION IN INDIVIDUALS RESIDING IN CURITIBA-PR.

Kelly Sandrin Golynski¹
Camila Moraes Marques²

Recebido em 20 de fevereiro de 2015

Aceito em 15 de junho de 2015

RESUMO

A *Influenza*, ou gripe, é uma infecção viral aguda do sistema respiratório, de elevada transmissibilidade e distribuição global. Há pelo menos 400 anos o *Influenza* causa pandemias. A maior delas historicamente registrada, conhecida como gripe espanhola, causada pelo vírus *Influenza A (H1N1)*. Em março de 2009, o *Influenza A/H1N1*, ressurgiu, com uma nova mutação, causando 12.800 óbitos no mundo, no Brasil, 2.051 óbitos e mais de 44 mil casos da doença foram confirmados e a maior incidência ocorreu nas regiões Sul e Sudeste. Vacinas contra a pandemia da gripe A/H1N1 foram desenvolvidas, e programas de vacinação foram implementados em vários países, bem como para tratamento foi indicado o uso do Oseltamivir. Neste presente artigo, há o objetivo de avaliar os casos de *Influenza A (H1N1)* acometidos pela nova variante do vírus A/H1N1 e a avaliação do impacto da vacina pós-pandêmica. Onde foi feito um estudo retrospectivo por meio de análises de prontuário médico e fichas de investigação de casos confirmados de *Influenza A (H1N1)* e suspeitos na cidade de Curitiba, Paraná, no Hospital do Trabalhador, no período de 04 (quatro) anos, com a finalidade de traçar um perfil epidemiológico dos casos. Foram analisados 102 casos (2009 a 2012), dentre eles 61 casos suspeitos e 41 casos confirmados de *Influenza A (H1N1)*. Mulheres gestantes e jovens sofreram a maior incidência dos casos. Sinais clínicos da gripe A/H1N1 foram semelhantes aos da gripe Sazonal.

Palavras-chaves: vírus da influenza A subtipo H1N1; vírus da influenza A; subtipo H1N1; orthomyxoviridae; vacina contra influenza.

ABSTRACT

Influenza, or flu, is an acute viral infection of the respiratory system, high transmissibility and global distribution. There are at least 400 years, the cause influenza pandemics. The largest recorded historically known as the Spanish flu, caused by Influenza A virus (H1N1). In March 2009, Influenza A/H1N1, has resurfaced with a new mutation, causing 12,800 deaths in the world, in Brazil, 2,051 deaths and over 44,000 cases have been confirmed and the highest incidence occurred in the South and Southeast regions. Vaccines against pandemic Influenza A/H1N1 have been developed, and vaccination programs have been implemented in several countries as well as for the use of Oseltamivir treatment was indicated. In this article, we had as its objective to evaluate the cases of Influenza A (H1N1) affected by the new variant of the A/H1N1 virus and evaluating the impact of the post-pandemic vaccine. Where he was made a retrospective study using medical record analysis and investigation forms of confirmed cases of Influenza A (H1N1) and suspects, in the city of Curitiba, Paraná, Hospital do Trabalhador, over the period of 04 (four) years, the purpose of outlining an epidemiological profile of cases. 102 cases were analyzed (2009 to 2012), including 61 suspected cases and 41 confirmed cases of Influenza A (H1N1). Pregnant women and young had the highest incidence of cases. Clinical signs of Influenza A/H1N1 were similar to Seasonal Flu.

Keywords: influenza A virus H1N1 subtype; influenza A virus; H1N1 subtype; orthomyxoviridae; influenza vaccines.

¹Bacharela do curso de Biomedicina pelo Centro Universitário Autônomo do Brasil - UNIBRASIL. Pós-graduanda em Biomedicina Estética pelo Núcleo de Estudos e Treinamento Ana Carolina Puga - NEPUGA. Contato: kellygolynski@hotmail.com ²Doutora em Fisiologia Humana pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS. Professora do Centro Universitário Autônomo do Brasil - UNIBRASIL. Pesquisadora no Instituto Denton Cooley. Contato: camilam14@gmail.com

INTRODUÇÃO

A *Influenza* ou gripe é uma infecção viral aguda do sistema respiratório, de elevada transmissibilidade e distribuição global⁽¹⁾. A primeira descrição científica do *Influenza* foi relatada a partir 412 a.C., na Grécia, Hipócrates – o pai da medicina – falava de uma doença respiratória que durou algumas semanas, matou muitas pessoas e, então, desapareceu⁽²⁾. Pertencente à família *Orthomyxoviridae*, seu agente etiológico é o *Myxovirus influenzae*, vírus com partículas envelopadas de RNA de fita simples segmentada e subdividem-se nos tipos A, B e C, sendo que apenas os do tipo A e B têm relevância clínica em humanos⁽³⁾. O vírus *Influenza A* apresentam maior variabilidade e, portanto, é dividido em subtipos de acordo com as diferenças de suas glicoproteínas de superfície, denominadas hemaglutinina (H) e neuraminidase (N). Há 15 tipos de hemaglutinina e 9 tipos de neuraminidase identificados em diferentes espécies animais. Atualmente são conhecidas três hemaglutininas (H1, H2 e H3) e duas neuraminidasas (N1 e N2) presentes no vírus *Influenza* do tipo A adaptadas para infectar seres humanos⁽³⁾.

O vírus *Influenza A* possui alta capacidade de causar pandemias. Desde o século XVI, o mundo experimentou uma média de três pandemias por século, com intervalos de 10 a 50 anos⁽⁴⁾. A maior delas historicamente registrada, conhecida como gripe espanhola, causada pelo vírus do *Influenza A* subtipo H1N1, ocorreu entre 1918-1919, contaminou mais de 600 milhões de pessoas em todo o mundo, com uma taxa de mortalidade estimada em 40 milhões de pessoas^(5,6). Após a gripe espanhola, mutações do vírus H1N1 ocorreram e resultaram nas pandemias de 1957 (Gripe Asiática) e de 1968 (Gripe de Hong Kong), nessa mutação ocorreu um novo vírus distinto do vírus *Influenza A* (H1N1) que circulou em 1918⁽⁶⁾. Entretanto, desde 1918 o vírus do *Influenza A* (H1N1) sofre significantes mutações, e no período de 1928 a 1934 uma nova mutação do vírus *Influenza A* (H1N1) ocorreu, como nos anos de 1947, 1951, 1975, 1977 e no período de 1997. Em 2003 mutações significantes ocorreram nesse subtipo A/H1N1, essa circulação e recombinação genética constante dos vírus ocorre pois o vírus do *Influenza* sofre mutações de caráter antigênico e funcional, o que ocasiona, frequentemente, o surgimento de surtos, epidemias e pandemias, sendo uma ameaça sempre presente para a saúde de pessoas e animais^(6,7) (Tabela 01)

Tabela 1 – Pandemias e Mutações do vírus *Influenza A/H1N1* desde 1918.

PERÍODOS	TIPO DE VÍRUS E MECANISMO DE MUTAÇÃO
1918 – 1919	H1N1 (Introdução viral, pandêmico)
1928 – 1929	H1N1 (Mutação pontual por <i>Drift</i> do H1N1)
1934 – 1936	H1N1 (Mutação pontual por <i>Drift</i> do H1N1)
1947 – 1948	H1N1 A (Rearranjo <i>Intrasubtipo</i> do H1N1)
1951 – 1953	H1N1 A (Rearranjo <i>Intrasubtipo</i> do H1N1)
1957 – 1958	H2N2 (Surgimento por <i>Shift</i> com o H1N1, causou a Gripe Asiática)
1968 – 1969	H3N2 (Surgimento por <i>Shift</i> com o H2N2, causou a Gripe de Hong Kong)
1972 – 1973	H3N2 (Nova variante por mutação <i>Drift</i>)
1975 – 1976	H3N2 e H1N1 vinda diretamente dos suínos
1977 – 1978	H3N2 (Novo subtipo por <i>Drift</i>) e H1N1 (Novo subtipo por mutação pontual <i>Drift</i>)
1997 – 1999	H3N2 A (na Austrália) e H1N1 (Novo subtipo por mutação pontual <i>Drift</i>)
2003 – 2004	H3N2 A (em Fuji) e H1N1 (Novo subtipo por mutação pontual <i>Drift</i>)
2009	H1N1 A (Nova mutação pontual <i>Drift</i> de origem suína – introdução)

Fonte: Adaptado de David M, Morens MD, et al. N. Engl J Med 361;3 July 16, 2009.

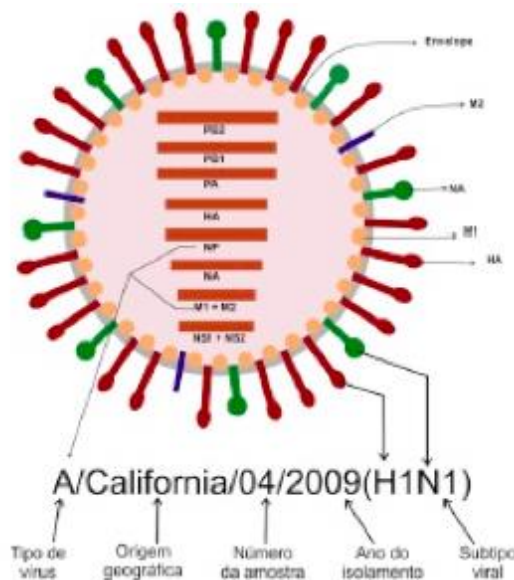
As mutações acontecem pois o vírus de *Influenza A* possui alta capacidade mutagênica, sendo capaz de acumular mutações pontuais e cumulativas nos genes de Hemaglutinina e Neuraminidase, havendo uma recombinação genética entre duas cepas virais diferentes, e essa mutação é conhecida como *antigenic-drift* que geralmente surge a cada um a três anos e é responsável pela ocorrência das pandemias em humanos^(8,9). Outra mutação que ocorre no vírus H1N1 é chamada de *antigenic-shift*, definida como o aparecimento de um novo vírus da *Influenza A* contendo um novo subtipo de Hemaglutinina ou de Hemaglutinina e Neuraminidase⁽⁹⁾. Porém, para que ocorra esta recombinação genética é necessária a existência de um hospedeiro intermediário que permita a infecção de duas cepas virais numa mesma célula, quando esse evento ocorre surge uma cepa viral totalmente nova, cuja população exposta provavelmente não apresenta imunidade prévia e, portanto, é mais vulnerável à infecção, pois a proteção adquirida contra um sorotipo do *Influenza A* não garante proteção cruzada contra outros, razão pela qual a gripe não confere imunidade permanente e acomete pessoas de todas as idades a cada surto⁽⁸⁾. O desenvolvimento de uma pandemia dependerá, então, do potencial desse novo vírus em causar doença entre humanos, bem como sua capacidade de disseminação⁽⁸⁾.

Em março de 2009, foram descritos os primeiros casos de doença respiratória aguda no México. No dia 12 de abril de 2009, o Governo do México respondeu a um pedido de verificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de um surto de infecções respiratórias

agudas na pequena comunidade rural de La Gloria, em Veracruz. Entre os dias 15 e 17 de abril de 2009, o Ministério da Saúde do México recebeu a notificação de um caso atípico de pneumonia grave rapidamente progressiva, ocorrendo principalmente no Distrito Federal (Cidade do México) e San Luis Potosi⁽¹⁰⁾. Posteriormente, o Centro de Controle de Doença dos Estados Unidos (CDC) identificou dois casos de doença respiratória febril aguda em duas crianças no sul da Califórnia, seguidos de casos semelhantes no Canadá⁽¹⁰⁾.

Embora a exata sequência dos eventos seja desconhecida, foram realizados estudos em maio de 2009, no quais se isolaram destes pacientes infectados uma nova variante do vírus *Influenza*; a detecção do vírus se deu a partir de exames realizados em duas crianças no estado da Califórnia, nos Estados Unidos (EUA). Espécimes foram coletadas dos pacientes com a doença respiratória e enviados ao laboratório de investigação do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos, que identificou, através da reação em cadeia pela polimerase em tempo real (RT-PCR), uma recombinação genética com genes de origem suína detectados em 1979 na Europa, genes de origem aviária e humana, resultando então numa tripla recombinação, classificada como A/CALIFORNIA/04/2009 (figura 01, página 05), disseminada rapidamente em todos os continentes do mundo^(8,11,12).

Figura 1 - Diagrama do vírus do *Influenza* A/H1N1 mostrando o envelope viral e os oito genes virais, bem como a nomenclatura utilizada.

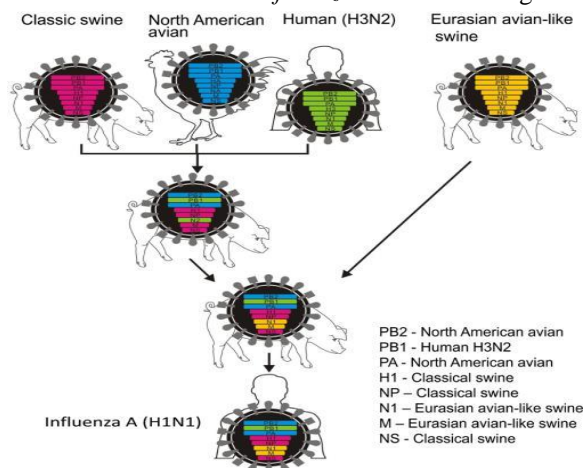


Fonte: Adaptado de Vincent et al. 2009.

Baseado na análise do sequenciamento genômico do vírus *Influenza* disponível no GENBank, esta combinação genética de segmentos de *Influenza* suína ainda não havia sido reconhecido previamente em isolados de suínos e humanos nos EUA, nem em outra parte do

mundo, caracterizando então uma nova mutação do vírus A/H1N1⁽⁸⁾. A figura 02 demonstra o reagrupamento entre o vírus *Influenza* H3N2 humano, *Influenza* aviário Norte-Americano e vírus suíno clássico (H1N2), resultando em um vírus (circula entre suínos na América do Norte) que mais tarde reagrupou com o vírus *Influenza* suíno tipo-aviário da Euroásia, originando assim o vírus *Influenza* A/H1N1⁽²⁴⁾.

Figura 2 – Gênese do vírus *Influenza* A/H1N1 de origem-suína.



Fonte: Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, v. 459, p. 931-939, 2009.

Após dois meses do primeiro caso de *Influenza* A (H1N1), já eram mais de 70 mil pessoas contaminadas, com 311 vítimas letais. Cerca de 200 países já contabilizavam casos da doença¹³. Em seu primeiro ano de circulação, o novo vírus H1N1 causou de 12.800 óbitos no mundo, sendo que a maior taxa de mortalidade ocorreu no continente americano, com 79,9 mortes e a cada 10 mil habitantes⁽¹³⁾. No Brasil, 2.051 óbitos e mais de 44 mil casos da doença foram confirmados no mesmo ano e a maior incidência ocorreu nas regiões Sul e Sudeste, em crianças menores de 2 anos e adultos com idade entre 20 e 29 anos⁽¹⁴⁾.

Os pacientes infectados pelo vírus A/H1N1 apresentam características clínicas como febre alta de maneira repentina (>38°C), seguida de mialgia, dor de garganta, coriza, artralgia, prostração, dor de cabeça e tosse seca. Outros sintomas como diarreia, vômitos e fadiga são menos comuns, mas podem estar presentes^(8,15). A transmissão da doença ocorre de pessoa a pessoa, através da inalação de gotículas eliminadas pela tosse, espirro ou por meio do contato direto com superfícies contaminadas com o vírus da *Influenza* A/H1N1, provenientes de secreções respiratórias ou fluidos corporais, e também por meio de aerossóis em situações especiais. Não há evidências que comprovem a transmissão da doença pela ingestão da carne de porco e seus derivados⁽⁸⁾. Os suspeitos de caso são medicados com Oseltamivir, devendo ser administrados até 48 horas a partir da data do início dos sintomas⁽¹⁶⁾. Em resposta imediata

ao novo vírus, com o intenso número de casos, laboratórios como Sanofi Pasteur[®], Novartis[®] e GSK[®] trabalharam para o desenvolvimento de uma vacina para que esse surto fosse imediatamente controlado⁽¹⁷⁾. De acordo com a OMS (2009), há estimativa mundial para produção de 3 milhões de doses de vacina por ano, o que imunizaria grande parte da população mundial^(17,18). Frente à evidente necessidade de imunização imediata da população, não houve disponibilidade de tempo para a realização de testes em largas escalas⁽¹⁷⁾.

A vacina foi composta por diferentes cepas do vírus *Myxovirus influenzae* inativados, fragmentados e purificados. A composição e concentração de antígenos hemaglutinina (HA) são atualizadas a cada ano, em função de dados epidemiológicos, segundo as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS), estes antígenos foram cultivados a partir de ovos embrionados de galinha^(19,20). O Ministério da Saúde do Brasil, em resposta à pandemia, organizou uma campanha nacional de imunização contra o vírus em Março de 2010, adquiriu cerca de 113 milhões de doses, sendo 68 milhões de doses sem adjuvante e 45 milhões de doses com adjuvante, para administração da população em etapas distintas⁽²¹⁾. A vacina protegeu contra os três principais vírus que circularam pelo hemisfério sul em 2010, A/CALIFORNIA/7/2009 (H1N1) - like; A/PERTH/16/2009 (H3N2) - like; B/BRISBANE/60/2008 - like⁽²²⁾.

O objetivo dessa operação de vacinação foi a proteção dos grupos de risco de desenvolver doença grave ou evoluir para morte durante a segunda onda da pandemia *Influenza A* (H1N1); os grupos prioritários a serem vacinados são trabalhadores de Saúde, por possuírem maior potencial de risco de contrair a infecção pelo vírus *Influenza* pandêmica (H1N1) pelo contato com possíveis suspeitos da doença⁽²¹⁾. Crianças de seis meses a dois anos incompletos, gestantes e portadores de doenças crônicas são classificados como grupos de atenção por já se encontrarem em situação de alta vulnerabilidade, podendo apresentar quadros de maior gravidade e morte; são classificados como grupos de maior atenção. A população adulta de 20 a 39 anos de idade e pessoas idosas acima de 60 anos também receberam a dose da vacina contra o H1N1⁽²¹⁾. A manutenção do estado imunizado requer reforço anual, haja vista pelo potencial de mutação que o *Influenza A*/H1N1 possui e por ser uma vacina *Influenza* fragmentada, inativada⁽²³⁾.

O objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação epidemiológica dos pacientes diagnosticados por *Influenza A* (H1N1), na cidade de Curitiba, Paraná, através de prontuário médico, e a avaliação do impacto da vacinação pós-pandêmico.

METODOLOGIA

Este projeto obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos SESA/HT pelo parecer ético sob o número 496.603.

Realizou-se um estudo retrospectivo através de análises de prontuário médico e ficha de investigação *Influenza* Humana por novo subtipo (pandêmico), de casos confirmados de *Influenza* A (H1N1) e suspeitos, atendido pela Instituição de saúde: Hospital do Trabalhador – HT, da cidade de Curitiba, Paraná.

A análise ocorreu num período de 04 (quatro) anos (2009 a 2012). Analisaram-se informações como faixa etária e sexo mais predispostos à infecção pelo A/H1N1, bem como a evolução clínica (óbito ou cura de *Influenza* A/H1N1), sinais clínicos de maior ocorrência em casos confirmados e análise de sinais clínicos de casos suspeitos e tratamento. Quantidade de casos/mês/ano de confirmados de *Influenza* A (H1N1).

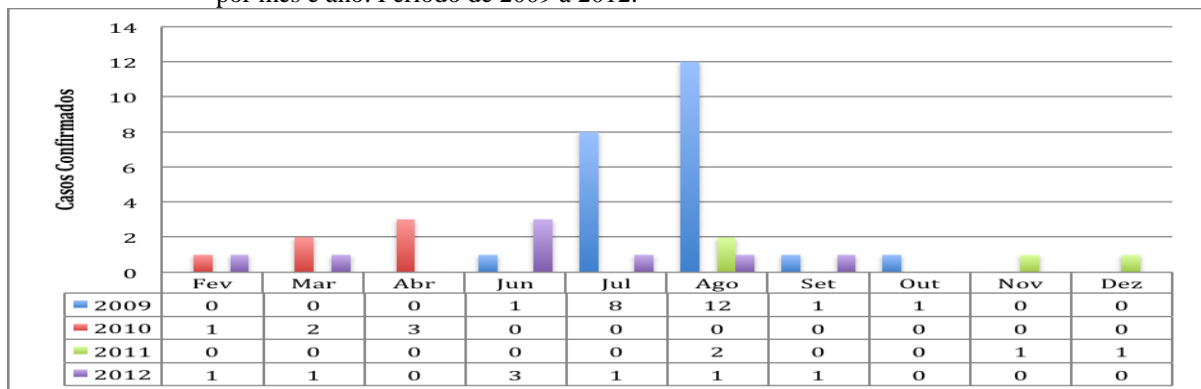
A partir disso, foram analisados e comparados à literatura e artigos científicos já publicados, bem como a análise da produção da vacina e o impacto na população. Tratamentos estatísticos foram realizados através de cálculos aritméticos para conhecer a porcentagem de cada caso analisado, bem como utilizando o programa da Microsoft Excel na confecção de gráficos para visualização dos resultados e, assim, possibilitando a comparação entre outras pesquisas realizadas referente ao *Influenza* A (H1N1),

RESULTADOS

Em abril de 2009, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC/EUA) identificou o vírus da *Influenza* pandêmica A/H1N1 2009 e, em julho, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou pandemia por esse novo subtipo viral. A situação epidemiológica dos casos de *Influenza* A (H1N1) em Curitiba/PR foi analisada entre os meses de junho de 2009 e setembro de 2012, durante o período de 04 anos, 41 casos confirmados de *Influenza* A (H1N1) no Hospital do Trabalhador, na cidade de Curitiba, estado do Paraná, e um total de 61 casos suspeitos de infecção pelo A/H1N1 durante este mesmo período dos casos confirmados. Através destas informações, foi analisado o número de casos confirmados pela nova mutação do vírus do *Influenza* A (H1N1), entre os anos de 2009 e 2012, separando-os por mês. O Gráfico 01 está demonstrando esta análise; em 2009, foram notificados 23 casos confirmados de A/H1N1 (período da pandemia), entretanto, a maior incidência foi no mês de agosto, contabilizando 12 casos. Em 2010, a notificação de casos confirmados foi de 06 pacientes,

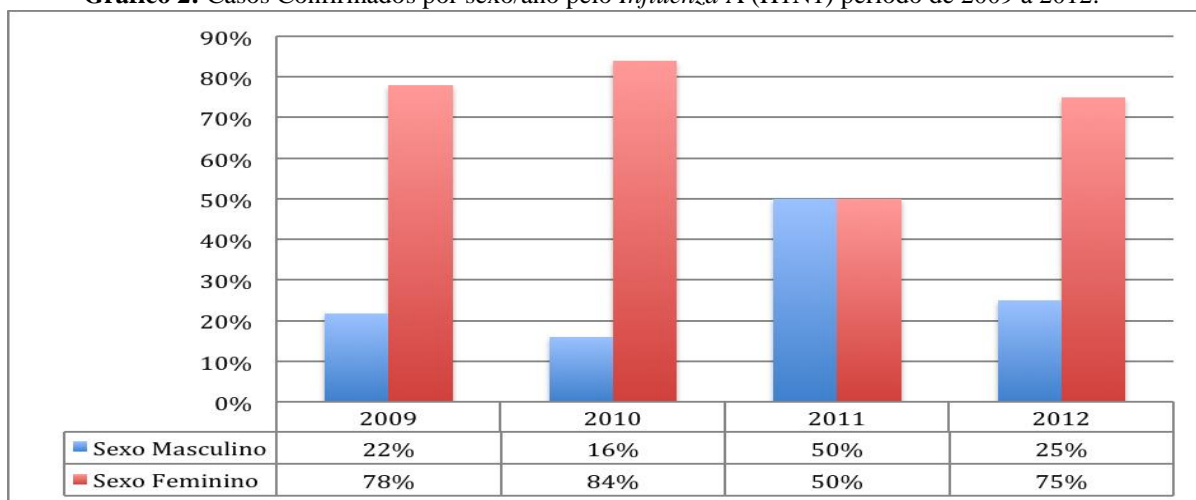
chamando atenção pelo período da notificação (fevereiro e março), 03 casos no verão. Em abril/2010, houve 03 casos confirmados pelo A/H1N1. Em seguida, no ano de 2011, o número de notificações de casos confirmados foi de 04, sendo 02 casos em agosto e 01 caso entre novembro e dezembro. No último ano de análise, 2012, o total de casos confirmados de *Influenza A (H1N1)* foi de 08, novamente chamando a atenção o período entre fevereiro e março, contabilizando 01 caso em cada mês mencionado. O mês de junho deste ano foi o que teve maior número de casos, porém, não alarmante, sendo de 03 pacientes infectados pela gripe A (H1N1).

Gráfico 1: Demonstração de análises de casos confirmados pelo vírus do *Influenza A (H1N1)*, separados por mês e ano. Período de 2009 à 2012.



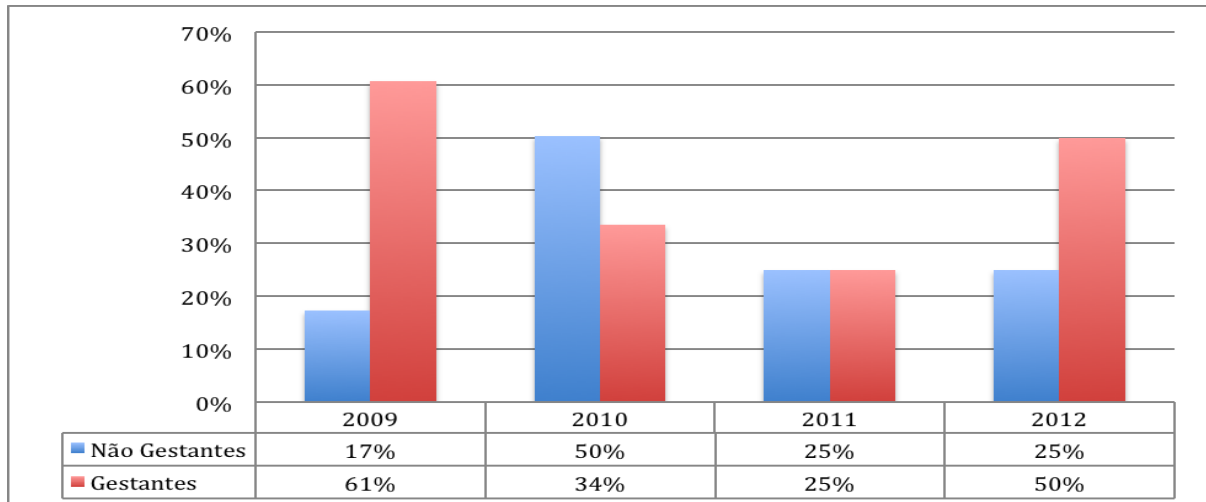
A faixa etária dos pacientes confirmados de *Influenza A (H1N1)*, no ano de 2009, variou entre 14 e 75 anos (mediana = 28 anos, média = 30,60 anos), sendo que dos 100% dos casos confirmados, 78% eram do sexo feminino e somente 22% do sexo masculino (Gráfico 02). No ano de 2010, a faixa etária dos casos confirmados foi de 08 a 45 anos (mediana = 22 anos, média = 25,5 anos), sendo dos 100% dos casos confirmados A/H1N1, 84% são do sexo feminino e, portanto, 16% do sexo masculino (Gráfico 02). No ano de 2011, a faixa etária dos casos confirmados foi de 01 a 52 anos (mediana = 23,5 anos, média = 25 anos), diante dos 100% de casos confirmados neste ano, 50% são do sexo feminino e outros 50% do sexo masculino (Gráfico 02). Portanto, no período do ano de 2012, a faixa etária dos casos confirmados de A/H1N1 foi de 02 a 47 anos (mediana = 22,5 anos, média = 23 anos), perante os 100% dos casos confirmados a porcentagem do sexo feminino foi de 75% e do sexo masculino 25% infectados pelo vírus do *Influenza A (H1N1)* (Gráfico 02).

Gráfico 2: Casos Confirmados por sexo/ano pelo *Influenza A (H1N1)* período de 2009 à 2012.



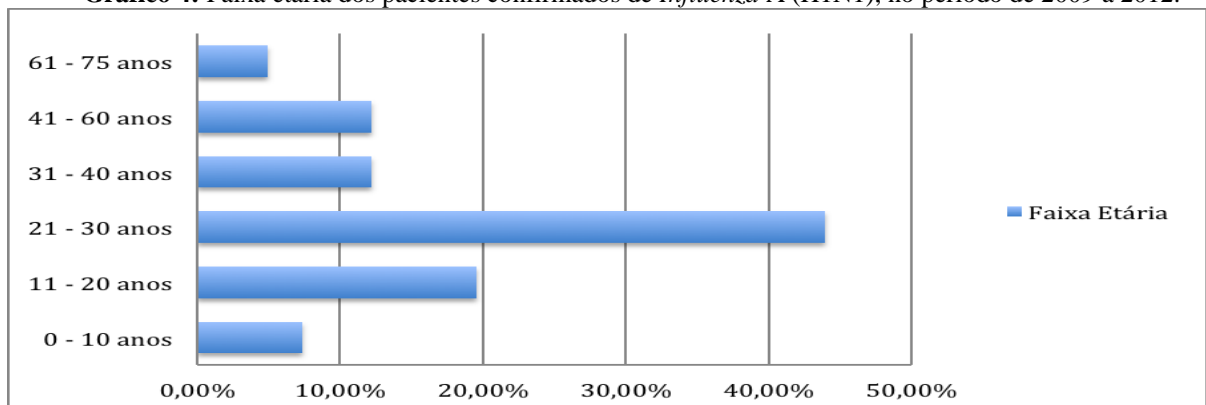
O Gráfico 03 (página 10) demonstra os casos confirmados entre mulheres gestantes e não gestantes, causados pelo vírus do *Influenza A (H1N1)*; observe-se, no ano de 2009, dos 78% de casos confirmados de mulheres, 61% era composto por gestantes e somente 17% não. No ano de 2010, dos 84% dos casos confirmados A/H1N1 do sexo feminino, 34% de mulheres gestantes e 50% não eram gestantes. No período de 2011, a porcentagem dos casos confirmados do sexo feminino foi de 50%, portanto, desses 50% dos casos, 25% eram gestantes e 25% não eram gestantes. No último ano de análise, em 2012, dos 75% dos casos confirmados de mulheres, 50% eram gestantes e, portanto, 25% não gestantes, com relação a esta análise observa-se o índice de predomínio de mulheres gestantes predispostas a contrair a infecção causada pelo vírus do *Influenza A (H1N1)*.

Gráfico 3: Resultado da análise percentual dos casos confirmados de A/H1N1, do sexo feminino de mulheres gestantes e não gestantes, no período de 2009 a 2012.



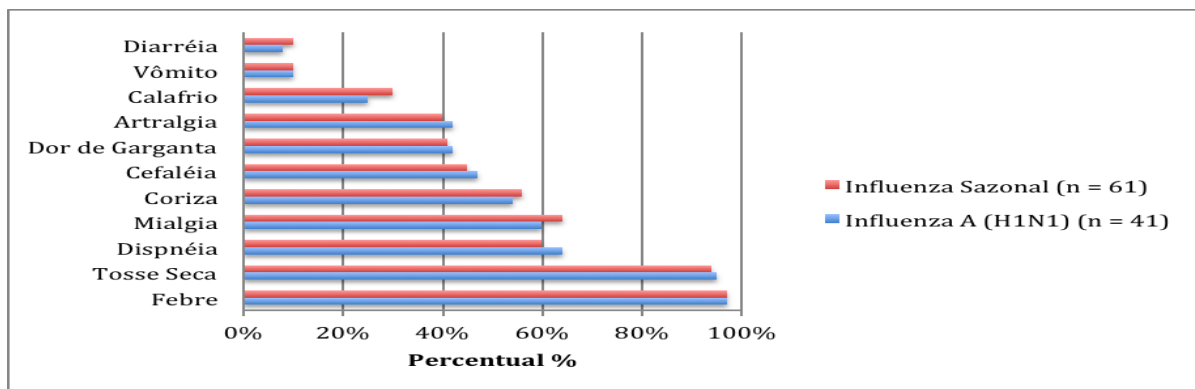
A faixa etária com maior predominância dos 41 casos confirmados, no período de 2009 a 2012, foi a de jovens entre 21 e 30 anos de idade, acometida com 43,90% dos casos, seguida de 19,51% entre 11 e 20 anos de idade, de 12,19% entre 31 e 60 anos. Os menos acometidos foram crianças de zero a 10 anos de idade com 7,31% e idosos entre 61 e 75 anos de idade com 4,87%, vistos no gráfico 04.

Gráfico 4: Faixa etária dos pacientes confirmados de *Influenza A (H1N1)*, no período de 2009 a 2012.



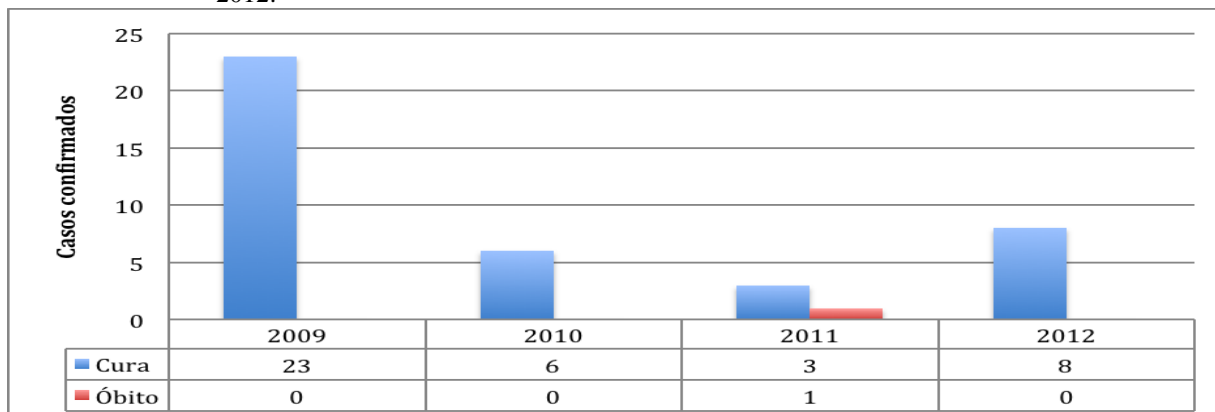
Os sinais clínicos, dos confirmados do *Influenza A (H1N1)*, mais predominantes foram febre (97% dos casos), tosse seca (95% dos casos), dispneia (64% dos casos), mialgia (60% dos casos), coriza (54% dos casos), cefaleia (47% dos casos), dor de garganta e artralgia (42% dos casos), calafrio (25% dos casos), e raramente sinais de vômito (10%), e diarreia (8%). Os casos foram confirmados através de exames laboratoriais a partir da análise de RT-PCR, em tempo real, os sintomas mais predominantes para o *Influenza Sazonal* apresentam frequências similares aos sintomas da gripe A/H1N1 (Gráfico 05, página 11).

Gráfico 5: Comparação de sinais clínicos entre o vírus do *Influenza A (H1N1)* e o vírus do *Influenza Sazonal*.



Os 41 casos confirmados pelo A/H1N1 e 61 casos suspeitos receberam tratamento com o medicamento de escolha, o fosfato de oseltamivir (Tamiflu[®]). No gráfico 06, mostra-se a evolução clínica dos casos confirmados de 2009 a 2012, em que apenas 01 óbito foi registrado no ano de 2011. Dados de pacientes vacinados, ou não, não foram obtidos por falta de informações relatadas nos prontuários médicos e fichas de investigação.

Gráfico 6: Evolução Clínica dos pacientes confirmados pelo *Influenza A (H1N1)*, nos anos de 2009 a 2012.



DISCUSSÃO

Em seu primeiro ano de circulação no Brasil, o *Influenza A (H1N1)* contabilizou mais de 44 mil casos confirmados, entre esses, 2.051 óbitos, cuja maior incidência ocorreu nas regiões Sul e Sudeste⁽²⁵⁾. Casos de *Influenza A* chegaram ao estado do Paraná no início de junho de 2009⁽²⁶⁾. Durante o período de pandemia e pós-pandêmico (2009 a 2012), no Hospital do Trabalhador, da cidade de Curitiba, estado do Paraná, foram notificados 41 casos confirmados dessa nova mutação do A/H1N1, entre esses 41 confirmados; no ano da pandemia (2009), foram registrados 23 casos, em 2010 nota-se a diminuição, sendo

notificados 06 casos, marcando, assim, o fim da pandemia causada pela gripe A (H1N1), sendo anunciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em todo o mundo.

As maiores ocorrências predominavam entre os meses de junho e agosto, em que a sazonalidade é bem característica, ou seja, no inverno o ar está mais frio e há menos água dissolvida nele, com isso o vírus sobrevive (continua infeccioso) no ar por mais tempo e é transmitido com mais eficiência. No verão, as temperaturas aumentavam, mas a água é dissolvida no ar e o vírus é viável por menos tempo, fazendo com que os casos de gripe se concentrem no inverno. Estes resultados sugerem que, em locais fechados, umidificadores de ar podem ser uma boa forma de prevenir a transmissão da gripe. O fator de o vírus ser mais transmitido em baixa pressão de vapor pode estar relacionado à formação de aerossóis e permanência dos mesmos no ar por períodos mais prolongados. Com isso, resta a dúvida de qual seria a forma de transmissão em países de climas tropical e subtropical que consegue manter o vírus em circulação durante o ano todo^(27,28).

O vírus do A/H1N1 vem sofrendo mutações em sua estrutura desde 1918 e a cada mutação uma nova pandemia é instalada, essas mutações são conhecidas como: a grande mutação (*antigenic-shift*), onde nesta mutação o vírus deixa de ser reconhecido pelo sistema imunológico dos indivíduos, se tornando assim um vírus totalmente novo, e a pequena mutação (*antigenic-drift*), ocorrendo pequenas mutações em suas glicoproteínas e em alguns indivíduos os anticorpos conseguem reconhecer e imunizá-lo. Este processo de imunização ocorre através da exposição prévia ao vírus, ou seja, através das análises feitas neste presente artigo demonstra que a faixa etária menos acometida foi a de idosos acima de 60 anos de idade por possuírem uma imunidade adquirida através da exposição prévia a essa linhagem, este processo ocorre através de exposições repetidas a este patógeno assim obtendo uma proteção imunológica, pois desde a grande pandemia conhecida como “gripe espanhola”, o vírus do *Influenza A (H1N1)* vem sofrendo pequenas mutações em sua estrutura e consequentemente idosos acima de 60 anos de idade possuem anticorpos que reconhecem a este vírus, mas se ocorrer uma grande mutação (*antigenic –shift*), seu sistema imunológico não o reconhecerá, pois ocorre uma mudança antigênica (resultado de um rearranjo) em que há um surgimento de nova hemaglutinina e/ou neuraminidase⁽²⁹⁾.

A grande preocupação que se instala no campo científico é a de que ocorra uma grande mutação na estrutura do vírus, essas variações maiores são associadas à completa substituição de um ou de ambos os segmentos do genoma viral que controlam a produção de glicoproteínas de superfície. Essas alterações se devem ao reagrupamento entre os vírus humanos e os vírus que infectam outras espécies animais. A tradução prática é que ao

ocorrem grandes variações antigênicas (*antigenic shift*), a maioria da população não tem imunidade para os novos vírus, podendo assim serem afetados indivíduos de todas as faixas etárias⁽³⁰⁾.

Entre essas notificações, o sexo feminino foi o mais acometido, sendo que, no ano de 2009, dos 100% dos casos confirmados 84% eram compostos de mulheres e, entre esta estatística, 61% eram gestantes. Nos anos seguintes casos confirmados em mulheres grávidas predominavam. Uma análise de 2009 a 2012 revelou que o vírus do *Influenza A (H1N1)* acometeu de forma mais severa as gestantes, entrando assim no grupo de risco para infecção do vírus da gripe A/H1N1. A explicação se deve à série de alterações fisiológicas que ocorrem no organismo, em que o sistema imunológico encontra-se deprimido em consequência da alteração de respostas humorais e celulares pelos antígenos específicos fetais, tornando mais suscetível aos patógenos intracelulares, tais como os vírus⁽³¹⁾. Além disso, ocorre aumento da frequência cardíaca e respiratória, bem como a diminuição da capacidade pulmonar. A gestação, especialmente no terceiro trimestre, é um fator de risco para complicações respiratórias e de admissão pela infecção pelo *Influenza A (H1N1)*, como também para o *Influenza Sazonal (gripe comum)*^(32,33).

As análises da progressão dos casos confirmados de A/H1N1, entre o período de 2009 a 2012, trouxe uma maior atenção referente aos sinais clínicos mais decorrentes, pois através de uma análise de casos confirmados de *Influenza A (H1N1)* e de casos confirmados de *Influenza Sazonal (gripe comum)*, ambos possuem sinais clínicos idênticos assim dificultando o diagnóstico prévio para o *Influenza A (H1N1)* e também chamando a devida atenção referente a casos confirmados de A/H1N1, onde através da análise de prontuário médico, observou que há casos confirmados de gripe A em que o paciente não apresentou um quadro clínico febril abrupto ($>38^{\circ}\text{C}$), apesar da literatura indicar que a gripe A/H1N1 apresenta como sintoma febre acima de 38°C . De todas as análises de caso, referente a estes 04 anos, todos os pacientes suspeitos e confirmados foram medicados com o fosfato de Oseltamivir (Tamiflu[®]), dos 23 casos confirmados, 22 foram curados, após a administração do mesmo, que demonstrou a eficácia do tratamento em correlação ao estado febril; porém, a tosse seca era de maior prevalência em todo o tratamento e apenas 1 óbito foi notificado, por consequência tardia ao tratamento e por apresentar comorbidades, pois o A/H1N1 superestimula o sistema imunológico, liberando citocinas no tecido pulmonar, o que atrai a migração de um número grande de leucócitos e causa a destruição do tecido pulmonar e a secreção de líquido para o órgão, tornando-se a respiração complicada⁽³⁴⁾. Tendo como consequência uma síndrome de angústia respiratória aguda (SARA), esta síndrome ocorre por

alteração na permeabilidade alvéolo-capilar com extravasamento de plasma para o interior dos alvéolos e formação de edema pulmonar não hidrostático, clinicamente o paciente apresentou quadro de intensa falta de ar (dispneia) e diminuição da oxigenação (troca gasosa), evoluiu-se então para a falência de múltiplos órgãos⁽³⁵⁾.

Uma das grandes preocupações a cada nova mutação do vírus do *Influenza A* (H1N1) seria com relação ao aparecimento de novas variantes resistentes aos antivirais como o fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®). No ano de 2009, o Centro de Controle e Prevenção de doenças registrou casos resistentes ao Fosfato de Oseltamivir, segundo fontes do órgão todos os pacientes estavam em estado crítico de saúde, apresentando sistema imunológico comprometido, além de outras condições médicas complexas⁽³⁶⁾. O *Influenza A* (H1N1) permanece sensível ao fosfato de Oseltamivir e a Zanamivir (Relenza®), mas resistente a Amantadina e Rimantadina. O Controle de Doenças (CDC) continua a recomendar a prescrição de fosfato de oseltamivir e zanamivir para o tratamento de todos os pacientes internados com infecção do novo vírus da gripe A (H1N1) suspeita ou confirmada, e para pacientes ambulatoriais que estão em maior risco de complicações relacionadas com a gripe (crianças, mulheres grávidas e pacientes com certas condições médicas crônicas). Novas cepas de vírus da gripe A (H1N1), mutação H275Y, são sensíveis ao zanamivir, portanto, para os pacientes imunocomprometidos o tratamento antiviral de escolha deverá ser o zanamivir⁽³⁷⁾.

O fosfato de Oseltamivir é uma pró-droga do carboxilato de Oseltamivir, tendo este medicamento de primeira escolha o mecanismo de ação parecido ao do segundo tratamento, o Zanamivir (Relenza®), como na inibição potente, e é altamente seletivo das enzimas neuraminidases (glicoproteína encontrada na superfície do *vírion*), reduzindo assim a propagação do vírus *Influenza A* e B, inibindo a liberação de vírions infecciosos de *Influenza* a partir das células infectadas do epitélio do trato respiratório e inibindo também a infecção e replicação *in vitro* do vírus da gripe e a replicação e patogenicidade *in vivo* do mesmo. O tratamento com Oseltamivir (Tamiflu®) e com Zanamivir (Relenza®) reduz com eficácia a duração dos sinais e sintomas clinicamente significativos da gripe em 32 horas^(38, 39).

O impacto da vacinação entre a população foi alarmante por não possuir o conhecimento referente à produção e ao vírus, porém desde o ano de 1999 é disponibilizado, no Brasil, a vacina trivalente que é composta por 03 vírus do *Influenza*, sendo eles *Influenza A* (H3N2), *Influenza B* e *Influenza A* (H1N1). O controle da atualização deste composto é feito pela Organização mundial da Saúde (OMS), que analisa a situação epidemiológica e de dados virológicos da gripe mundial (em cada hemisfério) todo o ano e promove uma

atualização se houver mutação presente nas cepas circulantes^(40,41). Foi então no ano de 2000 que o vírus do *Influenza A (H1N1)* sofreu uma mutação, assim havendo uma atualização na vacina, sendo composta então com a nova cepa, *Influenza A/NewCaledonia/20/99 (H1N1)*, e com outras cepas do *Influenza A/Sydney/5/97 (H3N2)* e *Influenza B/Beijing/184/93*. A partir desse ano o vírus do A/H1N1 não sofreu mutações, porém no ano de 2009 houve uma mutação nessa cepa que vinha circulando sem alterações desde 2000, sendo reconhecida como *Influenza A/California/7/2009 (H1N1)*, que resultou num reagrupamento entre o vírus *Influenza H3N2* humano, *Influenza* aviário Norte-Americano e vírus suíno clássico (H1N2), resultando em um vírus (circula entre suínos na América do Norte) que mais tarde reagrupou-se com o vírus *Influenza* suíno tipo-aviário da Euroásia, originando assim o vírus *Influenza A/H1N1*, causando uma pandemia^(24, 42).

Entretanto, com essa nova mutação do subtipo A/H1N1, uma atualização da vacina ocorreu, sendo disponibilizada no ano de 2010. Ao longo do ano de 2010, o vírus do *Influenza A (H1N1)* sofreu mutações, porém a análise antigênica desse novo vírus não é suficientemente diferente do vírus que acometeu a pandemia de 2009 o *A/California/7/2009*⁽⁴³⁾. Todavia, após o ano de 2010, no período de 2011 a 2013, o vírus do *Influenza A (H1N1)* não sofreu mutações significantes, ou seja, a atualização da cepa não foi necessária⁽⁴⁴⁾.

Para que ocorra a produção desta vacina, é utilizado o cultivo do vírus em ovos embrionados por possuírem tecidos suscetíveis ao vírus e são estéreis, o que diminui as chances de contaminação. A linhagem escolhida para compor a vacina não cresce bem em ovos, então ela precisa ser hibridizada com uma linhagem de bom crescimento. A mais usada desde a década de 1970 é a linhagem A/PR8/34. Os ovos precisam ter cerca de 10 dias para que a cavidade alantóica esteja do tamanho certo. Essa cavidade é o local onde o vírus (de escolha) será injetado e se replicará. Uma vez inoculados os ovos, eles precisam ser incubados por 02 ou 03 dias a temperaturas de 35°C a 37°C, período necessário para que o vírus possa se replicar em grandes quantidades dentro da cavidade alantóica. Após este período de incubação, o vírus é retirado da cavidade e purificado, passando pelo processo de inativação e fragmentação com o uso de reagentes como formol e detergentes e suas proteínas são purificadas, para que contenha apenas as proteínas Hemaglutinina e Neuraminidase. Uma vez purificadas as proteínas de cada linhagem vacinal, os três tipos de *Influenza* são misturados em uma mesma preparação que será testada e validada para o uso em humanos, ou seja, as reações que ocorrem após o indivíduo receber a vacina não são por apresentar o desenvolvimento do vírus e sim uma resposta imunológica aos fragmentos dos vírus, ou

Antígenos que estão presentes na composição, bem como se o indivíduo possuir uma reação aos reagentes presentes na vacina^(45,46,47). Em conclusão a vacinação contra o *Influenza A* (H1N1) parece diminuir a letalidade da infecção por essa cepa pandêmica, assim como as taxas de hospitalização, havendo uma diminuição de casos a cada ano⁽⁴⁸⁾.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vírus *Influenza A* (H1N1) possui uma grande importância para a pesquisa científica, desde 1918 vem passando por mutações significativas e preocupantes à saúde pública, a cada mutação pode gerar uma nova pandemia em que a população provavelmente não possui uma imunidade prévia e a necessidade de atualização constante da composição da vacina com as novas cepas circulantes. A partir das análises, obteve-se um perfil epidemiológico dos casos do *Influenza A* (H1N1), onde jovens e o sexo feminino (sendo gestantes e não gestantes) tiveram o maior número de casos confirmados, demonstrando assim a vulnerabilidade à infecção. Maior atenção nos sinais clínicos, demonstrando que o *Influenza A* (H1N1) possui o mesmo perfil do *Influenza Sazonal* em questões clínicas e da sua sazonalidade, em que picos de verão também estão propensos a casos do *Influenza A* (H1N1). Por fim, ressalta-se a importância da continuidade deste estudo.

REFERÊNCIAS

- 1 Cox NJ, Subbarao K. Influenza. *Lancet* 1999; 354:1277 - 82.
- 2 Toniolo JN. A história da gripe: A Influenza em todos os tempos e agora. São Paulo (SP): Dezembro Editorial; 2001.
- 3 Zimmer SM, Burke DS. Historical perspective: emergence of Influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med* 2009 July; 361(3): 279-85.
- 4 Reid AH, Taubenberger JK, Fanning TG. The 1918 Spanish influenza: integrating history and biology. *Microbes infection* 2001; 3: 81 - 7.
- 5 World Health Organization. Avian influenza: assessing the pandemic threat. Geneva: WHO; 2005.
- 6 Carneiro M, Trench FJP, Waib LF, Pedro FL, Motta F. Influenza H1N1 2009: revisão da primeira pandemia do século XXI. *Rev AMRIGS* 2010 abr-jun; 54(2): 206-213.

7 Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD. Introdução à Virologia Humana. 2 ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara Koogan; 2008. p. 532.

8 Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. 4 ed. 2 vol. Rio de Janeiro (RJ): Atheneu; 2009. p. 2233-2256.

9 Nakajima S, Nobusawa E, Nakajima K. Variation in response among individuals to antigenic sites on the HA protein of human influenza virus maybe responsible for the emergence of Drift strains in the human population. *Virology* 2000; 274: 220-231.

10 World Health Organization (WHO). Weekly epidemiological record. WHO Annual subscription 2009 Jun; 23: 213 - 36.

11 Martinez JAB. Influenza e publicações científicas. *J Bras Pneumol* 2009; 35(5): 399 – 400.

12 Bellei N, Melchior TB. H1N1: pandemia e perspectiva atual. *J Bras Patol Med Lab* 2011 Dez; 47 (6): 1676 - 2444.

13 Ministério da Saúde (BR). Boletim Eletrônico Epidemiológico. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010. Disponível em: URL: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_influenza_25_03.pdf>. Acessado em: 17 mai 2013.

14 Secretaria de Vigilância em Saúde. Influenza pandêmica (H1N1) 2009 – análise da situação epidemiológica e da resposta no ano de 2009. *Bol Electr Epid* 2010; 10 (10):1-21.

15 Machado AA. How to prevent, recognize and diagnose infection with the swine-origin Influenza A (H1N1) virus in humans. *J Bras Pneumol* 2009 May; 35 (5): 464 – 69.

16 Ministério da Saúde (BR). Influenza A (H1N1). Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2009. Disponível em: URL:<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/influenza_a_h1n1_protocolo_tratamento.pdf>. Acessado em: 17 mai 2013.

17 Ministério da Saúde (BR). Estratégia Nacional de Vacinação Contra o Vírus Influenza Pandêmico (H1N1) 2009. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010. Disponível em: URL:<http://www.conass.org.br/arquivos/file/informetecnico_05_03.pdf>. Acessado em: 17 mai 2013.

- 18 Ministério da Saúde de Portugal (PT). Produção Mundial de Vacinas contra a Gripe A (H1N1) ronda três milhões de doses anuais, segundo comunicado da OMS. Portugal (PT): Ministério da Saúde; 2009. Disponível em: URL: <<http://www.min-saude.pt/porta1/conteudos/a+saude+em+portugal/noticias/arquivo/2009/9/vacinas+a.htm>>. Acessado em: 17 mai 2013.
- 19 Sanofi P. Vacina Influenza (fragmentada e inativada). Val de Reuil 2010. Disponível em:URL:< http://www.sanofipasteur.com.br/sanofi-pasteur2/sp-media/AVPI_BR/PT/308/2132/Vaxigrip%202012_multi_paciente_aprovada.pdf >.Acessado em: 17 mai 2013.
- 20 GlaxoSmithKline©. Bula de medicamento. Vacina influenza (fragmentada, inativada). Dresden – Alemanha.
- 21 Ministérios da Saúde (BR). Estratégia Nacional de Vacinação Contra o Vírus Influenza Pandêmico (H1N1) 2009. Brasília (DF): Ministério da Saúde; 2010. Disponível em: URL: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_vacina_18_03_internet.pdf>. Acessado em: 17 mai 2013.
- 22 Kishida GDN. Vigilância Sanitária do Posto Aeroportuário de Guarulhos diante da Pandemia de Influenza A (H1N1) 2009 [mestreado]. São Paulo (SP): Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública; 2011.
- 23 Virella, G. Microbiology and Infectious Diseases. 3 ed. Lippincott Williams & Wilkins; 1997.
- 24 Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. Emergence and pandemic potential of swine-origian H1N1 *influenza* virus. Nature, v. 459, p. 931-939, 2009.
- 25 Secretaria de Vigilância em Saúde. Influenza pandêmica (H1N1) 2009: Análise da situação epidemiológica e da resposta no ano de 2009. Boletim Eletrônico Epidemiológico, v.10, n.1, p.1-21, 2010.
- 26 Duarte PAD, Venazzi A, Youssef NCM, Oliveira MC, et al. Pacientes com infecção por vírus A (H1N1) admitidos em unidades de terapia intensiva do Estado do Paraná, Brasil. Rev. bras. ter. intensiva. vol.21 no.3. São Paulo, July/Aug. 2009.

- 27 Shaman J, Kohn M. Absolute humidity modulates influenza survival, transmission, and seasonality *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106 (9), 3243-3248, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0806852106
- 28 Lowen A, Palese P. Transmission of influenza virus in temperate zones is predominantly by aerosol, in the tropics by contact: A hypothesis. *PLoS Currents Influenza*, 2009. DOI: RRN1002.
- 29 Manicassamy B, Medina R, Hai R, Tsibane R, et al. Protection of Mice against Lethal Challenge with 2009 H1N1 Influenza A Virus by 1918-Like and Classical Swine H1N1 Based Vaccines *PloS Pathogens*, 6 (1). Disponível em: URL: <<http://www.plospathogens.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.ppat.1000745>> Acessado em: 10 dez. 2013.
- 30 Forleo-Neto E, Halker E, Santos VJ, Paiva TM, Toniolo-Neto J. Influenza. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*. 2003, 36 (2):267-274.
- 31 Lim ML, Chong CY, Tee WS, Lim WY, Chee JJ. Influenza A/H1N1 (2009) infection in pregnancy – an Asian perspective. *BJOG*. 2010;117(5):551-6.
- 32 Hussell T, Wissinger E, Goulding J. Bacterial complications during pandemic influenza infection. *Future Microbiol*. 2009;4(3):269-72.
- 33 Miller AC, Safi F, Hussain S, Subramanian RA, Elamin EM, Sinert R. Novel influenza A(H1N1) virus among gravid admissions. *Arch Intern Med*. 2010;170(10): 868-73.
- 34 Carta Molecular. H1N1 – Influenza A. O centro de Genomas. n. 28. São Paulo. Disponível em: URL: <http://www.centrodegenomas.com.br/Arquivos/1/Carta_Molecular_N28.pdf>. Acessado em: 10 dez. 2013.
- 35 Barbas CSV, Amato MBP. Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo. Malorca: Permanyer Publications; 1998. 89p.
- 36 Fiocruz. Influenza A (H1N1): surgem notificações de cepa resistente ao Tamiflu.2009. Disponível em: URL: <www6.ensp.fiocruz.br/visa/?q=node/4140>. Acessado em: 10 dez. 2013.
- 37 CDC. Infección por el virus nuevo de la influenza A (H1N1) resistente al oseltamivir en dos pacientes inmunodeprimidos. 58(32);893-896, 2009. Disponível em: URL:

- http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5832a3_ensp.htm>. Acessado em: 10 dez. 2013.
- 38 Roche[®]. Tamiflu. Bula do Medicamento.
- 39 GlaxoSmithKline[®]. Relenza. Bula do Medicamento.
- 40 Gerdil, C. (2003). The annual production cycle for influenza vaccine *Vaccine*, 21 (16), 1776-1779.
- 41 Osterholm, M. (2005). Preparing for the Next Pandemic *New England Journal of Medicine*, 352 (18), 1839-1842.
- 42 Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Encontro Nacional de Vigilância Sanitária sobre a Pandemia de Influenza. Disponível em: URL: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/eventos/influenza/upibh.pdf>>. Acessado em: 10 dez. 2013.
- 43 World Health Organization. Influenza-update 120. 2010. Disponível em: URL: http://www.who.int/csr/disease/influenza/2010_11_09_GIP_surveillance/en/index.html>. Acessado em: 10 dez. 2013.
- 44 World Health Organization. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014 southern hemisphere influenza season. Set. 2013. Disponível em: URL: http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_south/en/index.html>. Acessado em: 10 dez. 2013.
- 45 Bae K, Junyoul C, Yangsuk J, Sangjeom A, Byngki H. Innovative vaccine production technologies: the evolution and value of vaccine production technologies. *Archives of Pharmacal Reserch* 32, no.4. Apr. 2009:465-480.
- 46 Kieny MP. The vaccine research of the World Health Organization, on swine flu. *Nature Internacional weekly journal of science*. 13 may 2009. doi:10.1038/news.2009.478.
- 47 Bucher D. The virus grower. *Nature Internacional weekly journal of science*. 14 may 2009. doi:10.1038/news.2009.482.
- 48 Lenzi L, Mello AM, Silva LRD, Grochocki MHC, Pontarolo R. Influenza pandêmica A (H1N1) 2009: fatores de risco para o internamento. *J. bras. pneumol.* vol.38 no.1. São Paulo, Jan/Fev. 2012.