



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ**  
**NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**  
**CURSO DE MESTRADO EM DOENÇAS TROPICAIS**

DEIMY LIMA FERREIRA

**DETECÇÃO DE VÍRUS *Influenza A* EM AVES MIGRATÓRIAS CAPTURADAS EM  
REGIÕES LITORÂNEAS DOS ESTADOS DA BAHIA, PARÁ E PERNAMBUCO**

BELÉM  
2014

DEIMY LIMA FERREIRA

**DETECÇÃO DE VÍRUS *Influenza A* EM AVES MIGRATÓRIAS CAPTURADAS EM  
REGIÕES LITORÂNEAS DOS ESTADOS DA BAHIA, PARÁ E PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais,  
pelo Núcleo de Medicina Tropical - Universidade  
Federal do Pará.

Orientadora: Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa

Co-orientador: Dr. Wyller Alencar de Mello

BELÉM  
2014

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
**Biblioteca Virtual em Saúde do Instituto Evandro Chagas (BVS IEC)**

---

Ferreira, Deimy Lima.

Detecção de vírus Influenza A em aves migratórias capturadas em regiões litorâneas dos estados da Bahia, Pará e Pernambuco / Deimy Lima Ferreira. - 2014

72 f.; 30 cm

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rita Catarina Medeiros Sousa

Dissertação (Mestrado em Virologia Molecular) – Universidade Federal do Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas, 2014.

1. Investigação epidemiológica. 2. Vírus Influenza A. 3. Gripe aviária. I. Sousa, Rita Catarina Medeiros, *orient.* II. Universidade Federal do Pará. III. Título.

CDD: 614.581

---



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

DEIMY LIMA FERREIRA

**DETECÇÃO DE VÍRUS *Influenza A* EM AVES MIGRATÓRIAS CAPTURADAS EM  
REGIÕES LITORÂNEAS DOS ESTADOS DA BAHIA, PARÁ E PERNAMBUCO**

Dissertação de Mestrado apresentada para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Aprovada em:  
Conceito:

**Banca Examinadora**

---

Prof. <sup>a</sup> Dra Rita Catarina Medeiros Sousa  
Orientadora – NMT/UFGA

---

Dr. Wyller Alencar de Mello  
Co-Orientador – IEC

---

Dr<sup>o</sup>. Leonardo dos Santos Sena  
Membro – UFGA

---

Dra. Daniele Barbosa de Almeida Medeiros  
Membro – IEC

---

Dra. Máisa Silva de Sousa  
Membro – UFGA

---

Dra. Luana da Silva Soares  
Suplente – IEC

*A minha mãe,  
Ana Silvia, como forma da minha enorme  
gratidão por todo o incentivo recebido, e in  
memorian de Ana Sara.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Ana Silvia, minha mãe, por toda ajuda e incentivo da forma mais singular que eu poderia receber;

Agradeço a grande ajuda que me foi dada por minha orientadora e amiga Rita Medeiros, pelos inúmeros ensinamentos, ela que muito contribuiu e contribuirá para a minha formação;

A meu Co-Orientador Dr. Wyller Mello, por toda ajuda e dedicação neste trabalho e por estar sempre disposto a ajudar e contribuir;

Ao Instituto Evandro Chagas na pessoa de sua diretora Dr<sup>a</sup>. Elizabeth Santos.

A seção de Virologia do IEC, representada pelo seu chefe Dr. Alexandre Linhares.

Ao meu irmão Vitor que eu tanto amo, e que faz a maior diferença nas minhas decisões e planejamentos e que quero sempre ao meu lado;

Aos meus irmãos Emerson e Carla pelo grande incentivo;

Meu amigo J, integrante ilustre da minha família, que verdadeiramente o melhor amigo do homem, um pequeno grande amigo;

A meus sobrinhos Lanna, Eduardo, Everton e Ana Vitória, titio ama muito;

Minha amada tia Sara que sempre será lembrada em nossas vidas;

A meu primo Anderson que sempre dá um jeito no meu computador;

Aos meus grandes amigos Mirian Bastos (Mira), Ivaldo Filho e Rosana Sarmento que fizeram, fazem e farão parte da minha vida, que tive o prazer de iniciar uma belíssima amizade, amo muito cada um de vocês;

A minha amiga Stephany (Stef) pela grande ajuda no desenvolvimento do projeto.

A minha família do LVR por todos os momentos inesquecíveis, em especial a Edna Souza (Filizzão), Mirleide Santos, Luana Barbagelata, Jessylene Ferreira e Raimundo Pacheco que fizeram parte diretamente da minha evolução científica e pessoal, um verdadeiro prazer conviver com vocês diariamente ao longo desses cinco anos de IEC. Ainda Patrícia Vilança, Erika Gomes, Mauro Brabo, Mariele Gonsalves e Sabrina aos quais tenho um grande carinho e que adoro a companhia de trabalho e amizade;

Aos meus amigos/irmãos Luís, Kaio, Akim, ótimas companhias de trabalho e diversão e que espero sempre manter contato;

*"Para realizar grandes conquistas,  
devemos não apenas agir, mas também  
sonhar; não apenas planejar, mas também  
acreditar."*

*Anatole France.*



## RESUMO

O vírus *Influenza A* é conhecido pela sua capacidade de infectar uma ampla variedade de animais, como os mamíferos (humanos, suínos, equinos, cetáceos, morcegos), aves domésticas (galinha [*Gallus gallus*], ganso, peru [*Meleagris ocellata*]), além de aves selvagens das ordens *Charadriiformes* (gaivotas, andorinhas, aves marinhas e maçaricos) e *Anseriformes* (pato, ganso selvagem e cisne) sendo estas seu hospedeiro natural. Compreender o movimento de longa distância de aves selvagens migratórias é crucial para explicar a circulação de vírus da gripe aviária. Este evento de circulação faz com que as aves atuem como importante meio de propagação do vírus ao longo de uma rota migratória, fato este já amplamente aceito. Entre os anos de 2006 e 2007 foram coletadas 2.252 amostras (*swab* de traquéia e cloaca), obtidas em locais que fazem parte da rota de migração do Atlântico e Mississipi, a partir de uma variedade de espécies de aves em regiões dos estados da Bahia, Pará e Pernambuco, para vigilância epidemiológica dos vírus *Oeste do Nilo* e *Influenza*. O objetivo deste estudo foi investigar a circulação de vírus *Influenza* entre aves migratórias que utilizam as rotas que passam pelos estados brasileiros supracitados. Para isso, as amostras foram analisadas através de técnicas de biologia molecular, que compreenderam duas etapas principais: a) extração de DNA/RNA a partir do espécime biológico; b) amplificação do gene controle codificador da Citocromooxidase pela técnica Reação em Cadeia mediada pela Polimerase (PCR) e amplificação do RNAv pela técnica de Transcrição Reversa seguida pela PCR em tempo real (RT-qPCR). Os resultados obtidos mostraram que do total de amostras testadas, 7,2% (n = 158) foram positivas por rRT-PCR para o vírus *Influenza A*. Observou-se uma diferença de positividade para o vírus entre as espécies de aves analisadas, sendo esta de 3,6% para a ordem *Charadriiformes*, 26,3% entre as aves da a ordem *Anseriformes*, 5,3% das aves pertencentes a ordem *Pelecaniformes* e 10,9% para aquelas da ordem *Suliformes*. Entre as amostras das ordens *Passeriformes* e *Columbiformes*, nenhuma amostra revelou-se positiva para vírus *Influenza*. Os dados sugerem variação entre os locais de coleta, tendo o estado do Pará com o menor percentual de positividade, a Bahia com segunda maior taxa e por fim Pernambuco apresentando maior valor de prevalência absoluta. Este estudo mostra que apesar de raras investigações realizadas no território brasileiro, constata-se circulação de vírus *Influenza A* entre diversas espécies de aves migratórias que utilizam os estados do Pará, Bahia e Pernambuco como locais de parada e reprodução de suas espécies. Estes achados justificam novas investigações para compreender a dinâmica dos vírus da gripe aviária na população de aves selvagens circulantes no Brasil, e seu papel como fonte em potencial de infecção para outros animais, inclusive o homem.

**PALAVRAS CHAVES:** Investigação Epidemiológica, Vírus *Influenza A*, Gripe Aviária.

## ABSTRACT

The Influenza virus is known for its ability to infect a wide variety of animals, such as mammals (humans, pigs, horses, whales), domestic birds (chicken [*Gallus gallus*], goose, turkey [*Meleagris ocellata*]) beyond wild birds of the orders Anseriformes (duck, wild goose and swan) and Charadriiformes (seagulls, swallows, aquatic birds and sandpipers) these being its natural host. Comprehend the movement of long distance migratory wild birds is crucial to explain the movement of avian influenza viruses. This event causes movement of the birds are acting as an important means of spreading the virus along a migratory route, a fact widely accepted. During the period 2006 and 2007, samples were collected 2,252 samples from a variety of bird species captured in locations which are part of the Atlantic migration route and Mississippi, in the states of Bahia, Para and Pernambuco for epidemiological surveillance of West Nile virus and influenza. The objective of this study was to investigate the circulation of influenza virus among migratory birds that use the routes that pass the above states. For this, the samples were analyzed by means of molecular biological techniques, which comprised two main steps: a) extraction of DNA / RNA from the biological specimen; b) amplification of the gene encoding cytochrome oxidase control of by the technical Polymerase Chain Reaction (PCR) and amplification of the vRNA by Real time Reverse Transcription polimerase chain reaction (RT-qPCR). The results obtained showed that the total samples tested, 7.2% (n = 158) were positive by RT-qPCR for Influenza A virus. We observed a difference in positivity for the virus among bird species analyzed, which is 3.58% for Charadriiformes order, 26.3% among the birds of the order Anseriformes, 5.3% of birds belonging to the order Pelecaniformes and 10.9% for those order Suliformes. Among the samples of the orders Passeriformes and Columbiformes, no sample was positive for Influenza Virus. The data suggest variation among the sampling sites, and the state of Para with the lowest percentage of positivity, the second highest rate with Bahia and Pernambuco finally presenting higher prevalence of absolute value. This study shows that although rare investigations in Brazilian territory, there has been movement of Influenza A viruses among several species of migratory birds that utilize the states of Para, Bahia and Pernambuco as stopping places and reproduction of their species. These findings justify further investigations to understand the dynamics of avian influenza viruses circulating in the population of wild birds in Brazil, and its role as a potential source of infection for other animals, including humans.

**KEYWORDS:** Epidemiological investigation, Influenza A virus and Avian Influenza.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1 - Micrografia eletrônica do vírus <i>Influenza A</i> pandêmico cultivado em cultura de células de rim canino (MDCK).	21
Figura 2 - Representação esquemática da partícula viral do vírus <i>Influenza</i> do tipo A e suas respectivas proteínas.	22
Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus <i>Influenza</i>	26
Figura 4 - Relações genéticas estabelecidas entre variantes do vírus <i>Influenza</i> 1918-2009.	29
Figura 5 - Rotas usadas por espécies de aves migratórias.	32
Figura 6 - Aves <i>Anseriformes</i> e <i>Charadriiformes</i> .	33
Figura 7 - Principais rotas migratórias usadas por aves selvagens para realizar o processo natural de migração	44
Figura 8 - Território Brasileiro com demarcação das localidades onde ocorreram as capturas e coleta de material das aves.	47
Figura 9 - Curva de amplificação RT-qPCR positivas para <i>Influenza A</i> gene Matriz	51
Figura 10: Principais espécies de aves positivas para <i>Influenza A</i> .	53
Figura 11 - Distribuição geográfica da espécie <i>Calidris minutilla</i>	57
Figura 12: Distribuição geográfica da espécie <i>Calidris ponsilla</i> .	58
Figura 13: Distribuição geográfica da espécie <i>Anas bahamensis</i> .	59
Figura 14: Distribuição geográfica da espécie <i>Sula dacylatra</i>	60
Figura 15: Distribuição geográfica da espécie <i>Dendrocygna bicolor</i>	61

## LISTA DE QUADROS

	<b>Páginas</b>
Quadro 1 - Proteínas codificadas pelos segmentos de RNA do vírus <i>Influenza A</i>	23
Quadro 2 - Subtipos de <i>Influenza Aviária</i>	36
Quadro 3 - Sequência de iniciadores utilizados na PCR para controle interno	49
Quadro 4 - Sequência de <i>primers</i> e sondas utilizadas na rRT-PCR	50

## LISTA DE TABELAS

### Páginas

Tabela 1 - Distribuição das amostras coletadas em 2006 e 2007 nos estados da Bahia, Para e Pernambuco.	46
Tabela 2 - Amostras positivas para Influenza A distribuídas de acordo com a ordem de classificação ornitológica.	52
Tabela 3 - Avaliação da significância estatística da positividade obtida entre as ordens ornitológicas.	53
Tabela 4 - Distribuição geográfica das amostras positivas entre as regiões dos estados coletados.	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### 1. Generalidades

a.C	Antes de Cristo
AS	Ácido Siálico
AS $\alpha$ 2,3Gal	Ácido siálico ligado a galactose por uma ponte $\alpha$ 2,3
AS $\alpha$ 2,6Gal	Ácido siálico ligado a galactose por uma ponte $\alpha$ 2,6
CEUA	Comissão de Ética no uso de animais
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Dideoxynucleotídeos
GAAP	Gripe Aviária de Alta Patogenicidade
GABP	Gripe Aviária de Baixa Patogenicidade
GAL	Galactose
IEC	Instituto Evandro chagas
MDCK	Cultura de células de rim canino ( <i>Madin Darbin Canine Kidney</i> )
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Ministério da Saúde
ng	Nano grama
nm	Nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia mediada pela polimerase
pH	Potencial de Hidrogênio
Pré-mRNA	Pré-Ácido ribonucléico mensageiro
RNA	Ácido ribonucléico
RNAc	Ácido ribonucléico complementar
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNAv	Ácido ribonucléico viral
RNAv	Ácido ribonucléico viral
RT-qPCR	Transcrição Reversa seguida pela reação em cadeia mediada pela polimerase em tempo real
SVS	Sistema de vigilância em Saúde
TAE	Tris acetato de etídeo

### 2. Proteínas Virais

H, HA	Hemaglutinina
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
N, NA	Neuraminidase
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2 / NEP	Proteína não estrutural 2
PA	Polimerase ácida
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PB1-F2	Polimerase básica 1- frame 2

RNP

Ribonucleoproteína

## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO .....	17
2- JUSTIFICATIVA .....	18
3- OBJETIVOS .....	19
3.1- GERAL.....	19
3.2- ESPECÍFICOS.....	19
4- REFERENCIAL TEÓRICO.....	20
4.1- O VÍRUS <i>Influenza</i> .....	20
4.2- NOMENCLATURA.....	20
4.3- ESTRUTURA VIRAL.....	20
4.4- ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL .....	21
4.5 - REPLICAÇÃO DO VÍRUS <i>Influenza A</i> .....	24
4.6- VARIABILIDADE ANTIGÊNICA .....	26
4.6.1- <i>Drift</i> ANTIGÊNICO .....	27
4.6.2 <i>Shift</i> ANTIGÊNICO .....	27
4.7- HISTÓRICO .....	27
4.8- EPIDEMIOLOGIA .....	31
4.8.1- AS AVES COMO HOSPEDEIROS NATURAIS DO VÍRUS <i>Influenza</i> .....	31
4.8.2- A GRIPE AVIÁRIA .....	34
4.8.3- PATOGÊNESE DA GAAP .....	37
4.8.4- O VÍRUS <i>Influenza A H5N1</i> .....	38
4.8.5- TRANSMISSÃO, DISTRIBUIÇÃO E DISSEMINAÇÃO .....	40
4.8.6- SINAIS CLINICOS DA GRIPE EM AVES .....	41
4.8.7- SINAIS CLINICOS DA GRIPE AVIARIA EM SERES HUMANOS .....	42
4.8.8- A <i>Influenza</i> AVIÁRIA COM IMPORTÂNCIA PARA ECONOMIA .....	42
5 - MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5.1 - TIPO DE ESTUDO.....	45
5.2 - ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO .....	45
5.3 - ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA .....	45
5.4 - ÁREA DE ESTUDO .....	45
5.5- COLETA DAS AMOSTRAS .....	47



5.6- EXTRAÇÃO DE DNA / RNA .....	48
5.7- REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DA CITOCROMOOXIDASE. ....	48
5.8- DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (rRT-PCR).....	49
5.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
6- RESULTADOS.....	51
6.1- AMOSTRAS ANALISADAS .....	51
6.2- DETECÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA TÉCNICA DE rRT-PCR PARA <i>Influenza A</i> .....	51
6.3 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS POR CLASSIFICAÇÃO ORNITOLÓGICA.....	52
6.4 - AS ESPÉCIES DE AVES INFECTADAS PELO VIRUS INFLUENZA.....	53
6.5- VARIAÇÃO GEOGRÁFICA.....	54
7- DISCUSSÃO .....	55
8- CONCLUSÕES.....	64
9- REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO .....	65
10- ANEXO.....	72

## 1- INTRODUÇÃO

O vírus *Influenza A* é conhecido pela sua capacidade de infectar uma ampla variedade de animais, como os mamíferos (humanos, suínos, equinos, cetáceos, morcegos), aves domésticas (galinha [*Gallus gallus*], ganso, peru [*Meleagris ocellata*]), além de aves selvagens das ordens *Charadriiformes* (gaivotas, andorinhas, aves aquáticas e maçaricos) e *Anseriformes* (pato, ganso selvagem e cisne) sendo estas seu hospedeiro natural. Análises genéticas indicam que estes vírus apresentam um estado de mudanças evolutivas dentro de seu reservatório natural, com a maioria dos genes que codificam para as proteínas virais internas apresentando elevada conservação e os codificadores das glicoproteínas de superfície com maior taxa de mutação (WRIGHT et al. 2007; HARRIS et al., 2010).

As aves selvagens, especialmente as migratórias, são os hospedeiros mais relatados dos vírus *Influenza* o que representa grande potencial de disseminação viral a outras aves e animais aquáticos (KIM et al., 2009).

Compreender o movimento de longas distâncias de aves migratórias é crucial para explicar a circulação de vírus da gripe aviária. Este evento de circulação faz com que as aves atuem como importante meio de propagação do vírus ao longo de uma rota migratória, fato este já amplamente aceito (STALLKNECHT e BROWN 2008).

Por interações genéticas entre cepas de diferentes origens, um novo vírus pode formar-se a partir da troca de segmentos gênicos (rearranjo genético). De fato, a natureza segmentada do genoma de RNA do *Influenza* favorece este tipo de evolução genética, evento que pode gerar vírus mais facilmente adaptáveis ao homem, o que pode ser o gatilho para produzir pandemias (ANDRADE, 2009; ALEXANDER et al., 2009).

## 2- JUSTIFICATIVA

O Brasil faz parte das rotas migratórias de aves selvagens vindas do norte do continente americano. O monitoramento de infecção pelos vírus *Influenza* em aves selvagens, principalmente, aves aquáticas migratórias, é de fundamental importância, não somente devido às implicações econômicas, mas fundamentalmente devido implicações na saúde da população humana.

O conhecimento dos padrões que definem a circulação do vírus *Influenza A* entre populações de aves nas rotas migratórias é necessário para melhor compreensão e previsão de possíveis riscos de propagação viral de forma direta ou indireta para outros animais e até mesmo ao homem. Através da pesquisa de vírus *Influenza A* em aves silvestres será possível obter informações sobre sua circulação em populações aviárias, que anualmente visitam o território brasileiro. Pelo analisado, fica evidente a importância da vigilância dos possíveis vírus da gripe aviária circulante em nosso meio, principalmente, por trazer uma resposta ao serviço de epidemiologia, direcionando a melhor estratégia do serviço de saúde pública para medidas de controle, tais como: eventos de contenção de surtos, epidemias ou pandemia.

### 3- OBJETIVOS

#### 3.1- GERAL

Detectar o vírus *Influenza A* em aves migratórias capturadas em regiões litorâneas dos estados da Bahia, Pará e Pernambuco.

#### 3.2- ESPECÍFICOS

- ✓ Detectar o genoma do vírus da Influenza em amostras biológicas de aves migratórias capturadas nos estados da Bahia, Pará e Pernambuco;
- ✓ Descrever o perfil de distribuição das amostras positivas no território estudado;
- ✓ Verificar as espécies de aves com maior prevalência de infecção pelo vírus *Influenza* nas regiões estudadas;
- ✓ Associar aspectos ornitológicos das aves com infecção pelo vírus *Influenza*.

## 4- REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1- O VÍRUS *Influenza*

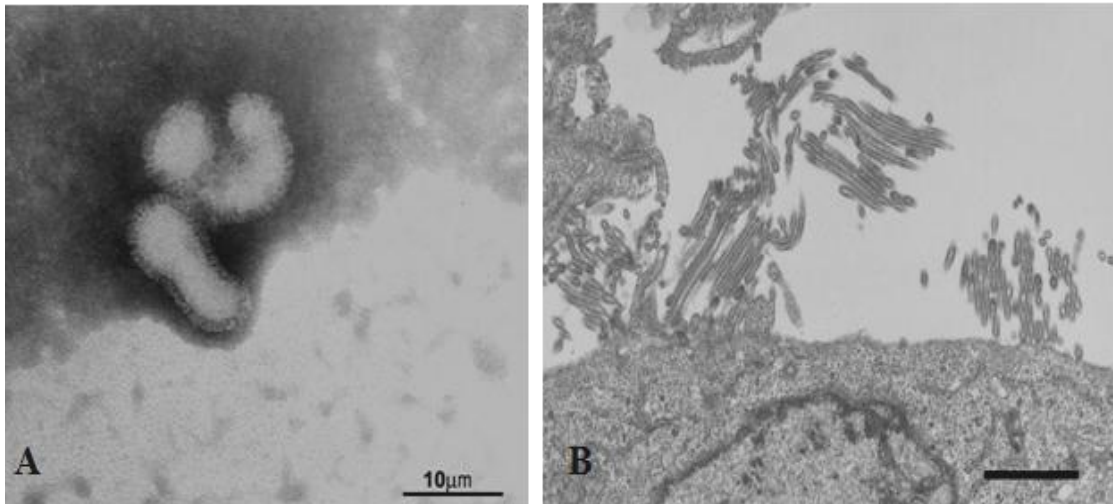
Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV- *International Committee on Taxonomy of Viruses*), o vírus *Influenza* pertence a família *Orthomyxoviridae*, a qual abriga cinco gêneros diferentes: *Influenzavirus A*, *B* e *C*, *Thogotovirus* e *Izavirus*. (PALESE e SHAW 2007; SWAYNE e HALVORSON 2008; CALISHER, 2009).

### 4.2- NOMENCLATURA

Em 1953, o Comitê de especialistas em *Influenza* da OMS recomendou que as cepas virais fossem classificadas em tipos A, B e C, com base em seus antígenos da ribonucleoproteína. Foi recomendado também que elas fossem designadas de acordo com um código uniforme que deve conter: a) o tipo viral, b) lugar de origem, c) número de registro laboratorial e d) ano de isolamento. Como exemplo: A/Inglaterra/1/53, onde “A” refere-se ao tipo, “Inglaterra”, para o lugar de origem, “1” para o número de registro no laboratório e “53” para o ano de isolamento. A nomenclatura dos vírus *Influenza A* de animais seguiu um padrão semelhante, com a designação de tipo específico de origem e da espécie que está sendo mostrado. Muitas vezes, uma designação subtipo foi incluído, por exemplo, A/equine-2/Miami/1/63, mas este foi revisto para aplicação do vírus de outras espécies hospedeiras (COUCEIRO e ALBUQUERQUE, 2008; SULLIVAN et al., 2010).

### 4.3- ESTRUTURA VIRAL

A morfologia primária do vírus *Influenza* é pleomórfica, os quais, após passagens *in vitro*, mostraram-se esféricos, com diâmetro de 80 a 120 nm. No entanto, partículas filamentosas com estrutura alongada (mais de 300 nm) têm sido observadas, particularmente em isolados clínicos a fresco. Na Figura 1, ambas as formas encontram-se ilustradas (PALESE e SHAW, 2007).



**Figura 1: Micrografia eletrônica de transmissão do vírus *Influenza A* (H1N1), cultivado em cultura de células de rim de canino (MDCK). A. Morfologia pleomorfo apresentando as projeções da superfície viral. B. As partículas virais apresentando a forma filamentososa de mais de 1µM de comprimento.**

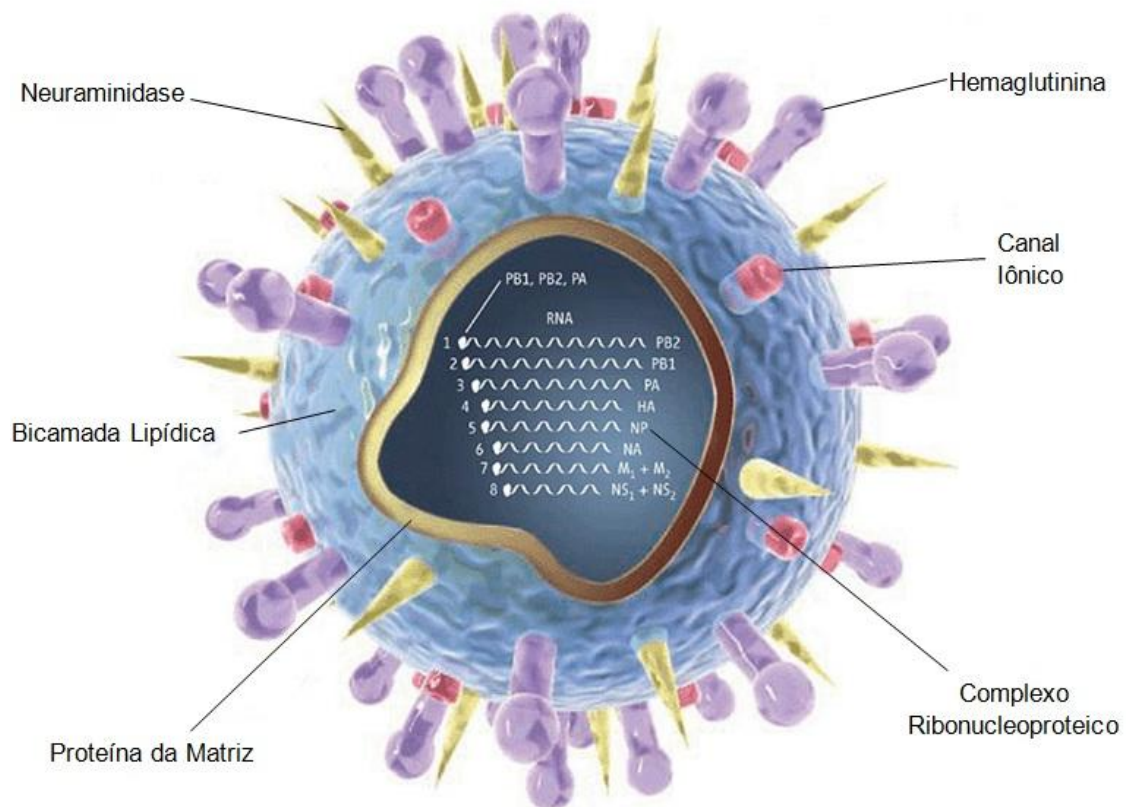
**Fonte: Figura 1.A, Laboratório de Vírus Respiratórios e Unidade de microscopia eletrônica do Instituto Evandro Chagas. Figura 1.B, NEUMANN et al., 2009.**

Os subtipos virais do tipo A são classificados de acordo com as características sorológicas de suas duas glicoproteínas de superfície: a Hemaglutinina (HA) e a Neuraminidase (NA). Foram descritos dezessete tipos de HA, denominados H1- H17 e nove subtipos de NA, denominados N1- N9 (FOUSHIER et al., 2005; TONG et al., 2012). A proteína HA 17 foi descrita pela primeira vez em 2012 em um vírus isolado de morcego e até o momento não se tem informações de sua presença em vírus isolados de outros animais (TONG et al., 2012).

#### 4.4- ORGANIZAÇÃO DO GENOMA VIRAL

O genoma do vírus *Influenza A* é composto de oito segmentos de RNA de fita simples, polaridade negativa, com 13.588 nucleotídeos (nt), que codificam onze proteínas (quadro 1). A partícula viral de aproximadamente de 10 a 14 nm de comprimento, possui uma estrutura complexa com membrana lipídica derivado da célula do hospedeiro (figura 2). Este envelope abriga a Hemaglutinina (HA), Neuraminidase (NA) e a proteína M2 que se projetam a partir da superfície do vírus. A proteína da matriz (M1) está logo abaixo do envelope. O núcleo da partícula viral é composto do complexo ribonucleoproteico (RNP), composto de segmentos de RNA viral, as proteínas da polimerase (PB1 [polimerase básica 1], PB2 [polimerase básica

2], e PA [polimerase ácida]), e a nucleoproteína (NP). A NEP/NS2 (proteína de exportação nuclear / proteína não estrutural 2) também está presente em amostras observadas de preparações virais purificadas (PALESE e SHAW, 2007; PALESE e BOUVIER, 2008).



**Figura 2:** Representação esquemática da partícula viral do vírus *Influenza* do tipo A e suas respectivas proteínas: PB1; PB2; PA; PB1-F2, HA; NP; NA; M1- M2; NS1 e NS2. Adaptado de KAISER, 2006.

Segmento	Tamanho (nt*)	Polipeptídio codificado	Tamanho (aa**)	Função
1	2.341	Polimerase básica 2 (PB2)	759	Componente da RNA polimerase, inicia a transcrição do RNAm viral, através do reconhecimento e ligação do <i>cap</i> dos mRNAs do hospedeiro.
2	2.341	Polimerase básica 1 (PB1)	757	Componente da RNA polimerase, catalisa a adição sequencial dos nucleotídeos durante o alongamento da cadeia de RNA. PB1 também é responsável pela ligação com as extremidades terminais de ambos os RNAv e RNAc para a iniciação da transcrição e replicação. A interação com a extremidade 3' do RNAv ativa a atividade endonucleásica da PB1, gerando o iniciador requerido para a síntese do RNAm.
		PB1- frame 2 (PB1-F2)	87	Pode ter um papel na modulação na resposta do hospedeiro acelerando a morte de células imunes.
3	2.233	Polimerase ácida (PA)	716	Componente do complexo polimerase, sua função específica ainda não está clara, mas têm sido descritas mutações que afetam a transcrição e replicação, indicando o possível papel em ambos os processos.
4	1.778	Hemaglutinina (HA)	550	Ligação aos receptores da célula hospedeira e fusão entre o envelope viral e membrana endossomal.
5	1.565	Nucleoproteína (NP)	498	Ligação e encapsidação do RNA viral associada as três proteínas do complexo polimerase.
6	1.413	Neuraminidase (NA)	454	Facilita a liberação do vírus das células infectadas pela clivagem do ácido siálico, libera a progênie viral dos receptores da célula hospedeira.
7	1.027	Proteína de matriz 1 (M1)	252	Forma um escudo em torno do nucleocapsídeo, embaixo do envelope viral. Desempenha um papel importante na montagem e empacotamento viral.
		Proteína de matriz 2 (M2)	97	Parece agir como um canal de prótons controlando o pH do Complexo de Golgi durante a síntese de HA e permitir a acidificação durante desencapsulamento do vírus
8	890	Proteína não estrutural 1 (NS1)	230	É abundante na célula infectada, principalmente no núcleo, onde regula a exportação nuclear de RNAm; proteína antagonista do interferon
		Proteína não estrutural 2 (NS2 / PEN)	121	Exportação de RNAv do núcleo para o citoplasma

**Quadro 1: Proteínas codificadas pelos segmentos de RNA do vírus *Influenza A*. Fonte: PALESE e SHAW, 2007, COUCEIRO e ALBUQUERQUE, 2008.**

\*nt: nucleotídeos,

\*\*aa: aminoácidos.



#### 4.5 - REPLICAÇÃO DO VÍRUS *Influenza A*

Os vírus *Influenza* ligam-se a célula hospedeira através da HA que reconhece os receptores de ácido siálico presentes na superfície da célula. Os ácidos siálicos (N-acetilneuramínico) estão presentes em muitos tipos de células e em várias espécies de animais. A interação desses vírus com a molécula de ácido siálico é limitada, pois as HA de vírus que replicam em diferentes espécies, mostram especificidade com os ácidos siálicos com diferentes ligações (PALESE E SHAW, 2007; BASLER E AGUIAR, 2008; BOUVIER e PALESE, 2008).

Os vírus *Influenza* de origem humana ligam-se, preferencialmente, aos receptores onde o ácido siálico (AS) se liga a galactose subjacente através da ligação  $\alpha 2,6$  ( $AS\alpha 2,6Gal$ ), enquanto que os vírus *Influenza* aviários reconhecem, preferencialmente, os receptores  $AS\alpha 2,3Gal$ . A ligação  $AS\alpha 2,6Gal$  predomina nas células epiteliais da mucosa nasal humana, faringe, traquéia e brônquios. Já o epitélio intestinal de aves aquáticas possui essencialmente a ligação  $\alpha 2,3$ . Contudo, estudos mostraram que receptores do tipo aviário podem estar presentes em células epiteliais humanas que revestem os bronquíolos respiratórios e as paredes alveolares. O epitélio respiratório de suínos apresenta ambos os receptores. Deve-se observar que essa especificidade não é absoluta, vírus aviários e humanos podem sofrer mutações e se adaptar para ambas as ligações (LEWIS, 2006; NEUMANN E KAWAOKA, 2006; BASLER e AGUIAR, 2008; BOUVIER e PALESE, 2008).

A ligação da HA aos ácidos siálicos induz a entrada do vírus na célula por endocitose, formando um endossoma. Os endossomas sofrem, então, acidificação no seu interior para permitir a mudança conformacional da HA que provoca a exposição do peptídeo de fusão da subunidade HA2. Dessa forma, ocorre a fusão das membranas viral e endossomal (LEWIS, 2006; BOUVIER e PALESE, 2008).

A acidificação do endossoma ativa também o canal de prótons (proteína M2), que transporta íons  $H^+$  para o interior da partícula viral, desestabilizando a proteína M1. A consequente desestruturação da camada composta pela M1 facilita a liberação dos RNPs virais (RNPs<sub>v</sub>) para o citoplasma da célula hospedeira. Os segmentos da partícula viral são, então, transportados para o núcleo da célula onde o RNA viral (RNA<sub>v</sub>), de sentido negativo, é transcrito em RNA mensageiro (RNA<sub>m</sub>) por um mecanismo *primer* dependente, com o auxílio dos cap do RNA<sub>m</sub> do

hospedeiro, que funciona como um iniciador (*primer*). Os RNAm neoformados são transportados para o citoplasma para que ocorra o processo de tradução (PALESE e SHAW, 2007; BASLER e AGUIAR, 2008; BOUVIER e PALESE, 2008).

Cada segmento viral codifica uma proteína, porém os RNAm dos segmentos dois, sete e oito podem sofrer *splicing* durante a transcrição e codificar duas proteínas, PB1 e PB1-F2, M1 e M2, e NS1 e NS2, respectivamente. A tradução dos RNAm que codificam as proteínas de membrana (HA, NA e M2) é feita nos ribossomos do retículo endoplasmático e as mesmas são glicosiladas no Complexo de Golgi, os demais são traduzidos nos ribossomos citoplasmáticos (BOUVIER e PALESE, 2008).

A síntese de RNAv é realizada pelo complexo de polimerases virais (PB1, PB2, PA e NP), grupo de proteínas com funções específicas nos diferentes passos da replicação viral. Durante a replicação, que também ocorre no núcleo e não depende de iniciadores, o RNA viral de sentido negativo serve como molde para a síntese do RNA complementar de polaridade positiva que, por sua vez, é usado como molde para a síntese do RNA viral genômico de fita negativa e, em seguida, síntese das RNPsv. As RNPsv neoformadas são exportadas para o citoplasma com a auxílio das proteínas M1 e NEP/NS2 (BOUVIER e PALESE, 2008).

Finalmente, as proteínas de membrana (HA, NA e M2), de matriz (M1) e as RNPsv (contendo o RNAv de fita negativa e as proteínas NP, as três polimerases e a NEP/NS2) são transportadas para o local de montagem na membrana plasmática, onde as partículas virais são construídas e liberadas para o exterior da célula. O mecanismo de empacotamento ainda não está bem compreendido e a liberação das partículas virais é facilitada pela NA, que remove os ácidos siálicos da superfície da partícula viral e da célula hospedeira, evitando que as partículas virais se agregem (PALESE e SHAW, 2007; BASLER e AGUIAR, 2008; BOUVIER e PALESE, 2008; ZHANG et al., 2009). A figura 3 ilustra o ciclo de replicação dos vírus *Influenza*.

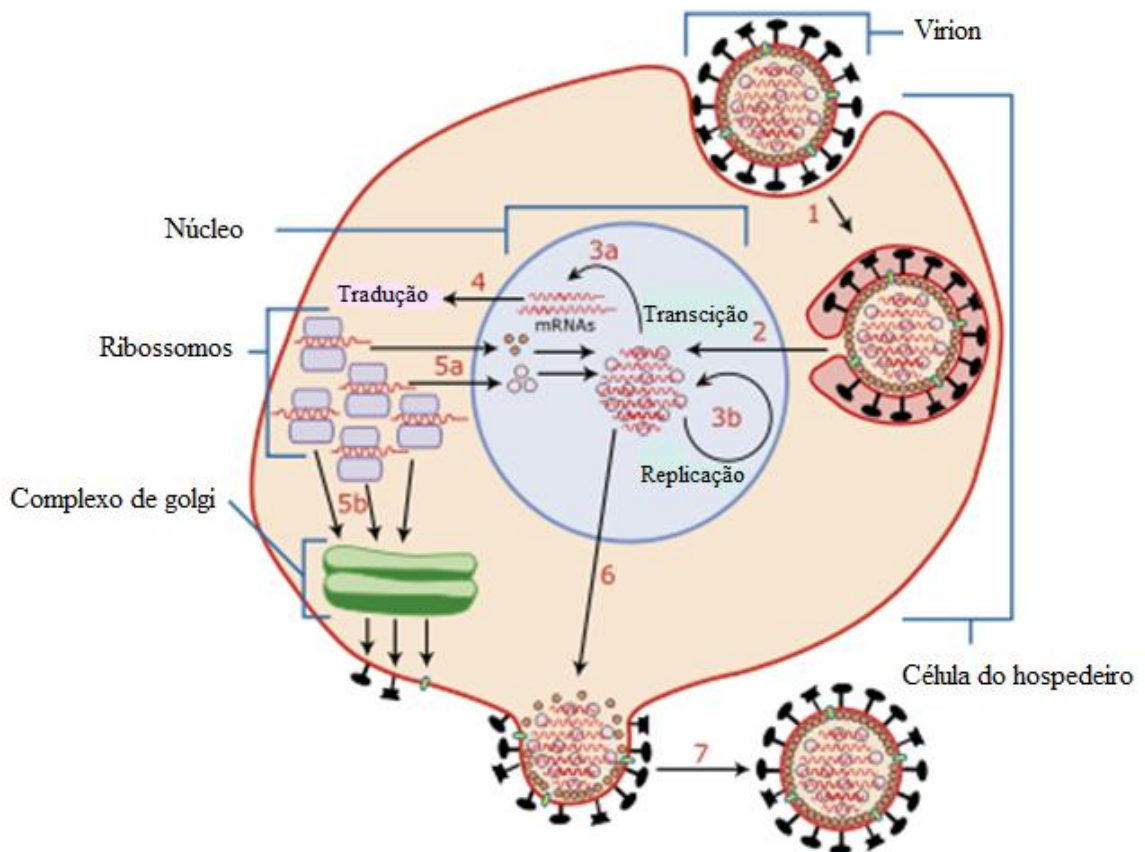


Figura 3: Representação esquemática do ciclo de replicação do vírus *Influenza*. Passos: 1- formação do endossoma, 2- migração dos nucleocapsídeos ao núcleo da célula, 3- a) transcrição realizada pelo complexo de polimerase viral, b) replicação do RNAv. 4- migração do RNA para o citoplasma, 5- a) migração das proteínas NP, NS1 e M1 sintetizadas nos ribossomos para o núcleo celular, b) transporte da HA, NA e proteína M via complexo de golgi para a membrana celular. 6- migração dos nucleocapsídeos formados no núcleo da celular para a membrana na região de fixação das HA, NA e M, 7- brotamento de novos vírions. Fonte: Modificado Fonte: <http://www.websters-online-dictionary.org/definitions/Influenza>.

#### 4.6- VARIABILIDADE ANTIGÊNICA

Dois mecanismos principais são responsáveis pela mudança contínua na antigenicidade do vírus *Influenza A*, denominados *drift* antigênico (mudanças menores) e *shift* antigênico (mudanças maiores) (ZAMBON 1999). Ambos contribuem para o escape viral ao sistema imunológico do hospedeiro.

#### 4.6.1- *Drift* ANTIGÊNICO

O *drift* antigênico é gerado a partir de mutações pontuais acumulativas, especialmente nos genes codificadores da HA e NA. A alteração em um único aminoácido na HA pode permitir que um vírus mutante escape à neutralização dos anticorpos gerados em infecções ocorridas em epidemias anteriores. Em mamíferos, variantes genéticas e antigênicas resultam da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico do hospedeiro. O *drift* antigênico também tem sido observado entre aves domésticas, embora em menor grau do que em humanos (SULLIVAN et al., 2010).

#### 4.6.2 *Shift* ANTIGÊNICO

O *shift* antigênico é o responsável pelo aparecimento de um vírus *Influenza A* contendo um novo subtipo de HA e/ou NA na população, os quais são imunologicamente distintos dos vírus *Influenza* que circulavam anteriormente. O *shift* antigênico ocorre quando um vírus *Influenza* animal, geralmente de origem aviária, adquire a capacidade de ser transmitido para o homem. Evidências sugerem que o surgimento de linhagens pandêmicas ocorre devido ao *shift* antigênico. Tal mecanismo de variação genética e antigênica é favorecido pela natureza segmentada do genoma viral que permite reagrupamento dos segmentos gênicos no momento da formação de uma nova partícula, mecanismo denominado de rearranjo genético (COX e SUBBARAO, 2000).

#### 4.7- HISTÓRICO

Ao longo da história da humanidade, diversos relatos de infecções respiratórias acometeram grande parcela da população mundial. Há relatos de epidemias e pandemias associadas a gripe desde 412 a.c sendo por tanto, uma das doenças infecciosas mais importantes da humanidade. Desde então, relatos científicos revelaram a ocorrência de epidemias em humanos nos anos de 1414, 1557, 1675-1676, 1788-1790 e em 1830-1832 (SMITH, 1995).

No século passado, ocorreram três pandemias de gripe: a Espanhola, em 1918, considerada a pandemia mais letal que se tem notícia, a Asiática em 1957, e

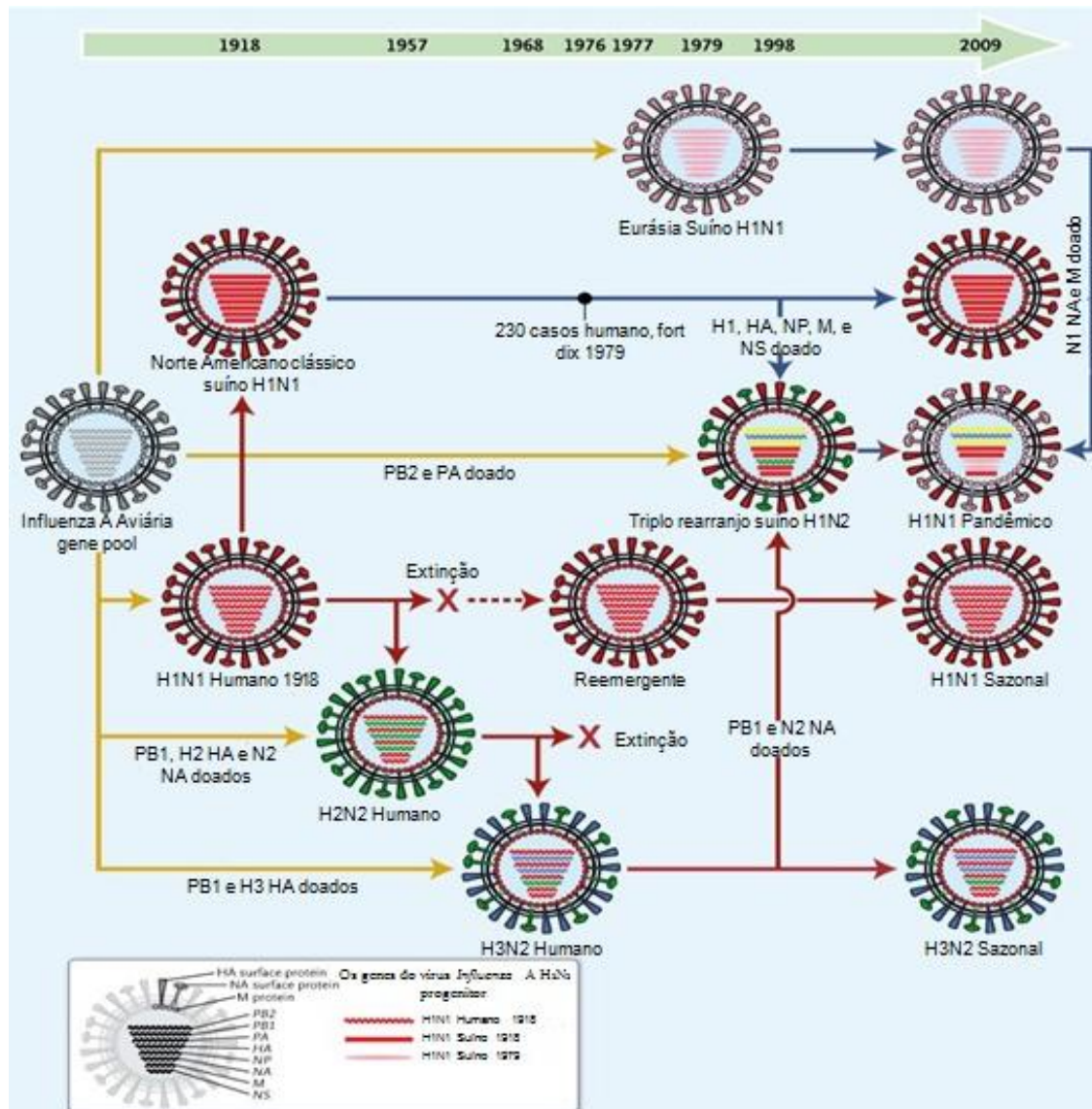
em 1968, a de Hong Kong. A mais recente pandemia foi a de 2009, considerada a primeira do século XXI (NEUMANN et al., KAWAOKA, 2009; SULLIVAN et al, 2010).

Apesar das epidemias e pandemias ocorrerem em seres humanos, a *Influenza* não está restrita à espécie humana sendo capaz de causar morbimortalidade em várias outras espécies de animais, dentre elas, as aves (NEUMANN et al., KAWAOKA, 2009).

A gripe aviária foi descrita pela primeira vez na Itália em 1878 por Perroncito como uma doença de aves, extremamente grave com alta letalidade. Inicialmente, ela foi confundida com uma forma aguda e septicêmica de cólera aviária e somente em 1955, o vírus foi caracterizado como sendo *Influenza*. No entanto, não se conhecia ainda o papel infeccioso dos vírus, cuja função seria descoberta 20 anos mais tarde por Iwanowski e a nova entidade infecciosa foi chamada de *tifo exudativus gallinarum* (SMITH, 1995).

Na metade do século XX, a gripe aviária já havia sido notificada na Europa, Ásia, África, América do Norte e América do Sul. Na primeira década deste século a doença foi verificada em todos os continentes. Assim sendo, a *Influenza* Aviária é um problema mundial cuja vigilância e prevenção requer esforço e cooperação internacionais (KLENK et al., 2008).

As informações científicas geradas ao longo das pesquisas desenvolvidas a partir da genética estrutural do vírus mostram que as partículas virais envolvidas nos principais eventos epidemiológicos são, em sua totalidade, de origem aviária ou possuindo importantes segmentos de vírus aviários para a composição da partícula atuante (Figura 4) (POTTER, 2001; WRIGHT et al, 2007; KLENK et al., 2008).



**Figura 4: Relações genéticas estabelecidas entre as variantes do vírus *Influenza* H1N1 1918-2009.** Setas amarelas mostram a inserção de um ou mais genes do *Influenza* aviária A. A seta vermelha tracejada indica um período sem circulação. Setas vermelhas contínuas indicam os caminhos evolutivos de linhagens de vírus da gripe humana. Setas contínuas azuis representam linhagens de vírus da gripe suína; e a seta azul a vermelho representam um vírus da gripe de origem suína para humano. Adaptado de DAVID et al., 2009.

A pandemia de 1918, também chamada de gripe espanhola, assolou o mundo, e foi a mais grave das pandemias que se tem notícia, pois foi responsável por mais de 20 milhões de mortes em todo o planeta. Contudo, devido a falta de registro em muitos países durante a pandemia, pesquisadores e historiadores relatam que o número possa ter superado a faixa de 40 a 50 milhões de mortes. Estudos recentes, feitos com sequências genômicas recuperadas a partir do tecido pulmonar preservado das vítimas da pandemia de 1918, mostraram que o vírus causador desse episódio da história da gripe é similar ao A H1N1 aviário e que

contém uma assinatura de aminoácidos do tipo viral associado a do tipo humano em várias proteínas (POTTER, 2001; WRIGHT et al., 2007).

O vírus pandêmico que surgiu em 1957 é um descendente direto do vírus pandêmico H1N1 de 1918 que, de alguma forma, adquiriu três novos segmentos de genes de vírus aviário (TAUBENBERGER e MORENS, 2010). Os genes que codificam as duas proteínas da superfície viral, que eram H1 e N1, foram substituídos, respectivamente, pelos subtipos H2 e N2 de origem aviária, através do mecanismo de rearranjo genético entre vírus humano/aviário. Além desses, o gene que codifica a polimerase PB1 também foi substituído por um gene de origem aviária (NEUMANN et al., KAWAOKA, 2009; TAUBENBERGER e MORENS, 2010).

A pandemia de 1968 se deu após 11 anos, quando o vírus *Influenza A* H2N2 foi substituído por outro, após rearranjo genético humano/aviário que incluiu os genes H3 e PB1 de origem aviária, resultando na cepa H3N2. Os outros seis segmentos gênicos, incluindo o gene codificador da NA, do H2N2 de 1957 foram mantidos (NEUMANN et al., KAWAOKA, 2009; TAUBENBERGER e MORENS, 2010).

Em 1977 ocorreu a re-emergência do vírus H1N1 e a epidemia foi denominada gripe Russa. Este evento foi caracterizado pela capacidade do vírus *Influenza* em infectar, principalmente, crianças e jovens, sendo as pessoas com mais de 50 anos pouco afetadas. Assim, atingiu mais de 50% das crianças em idade escolar em todo o globo, no entanto, não foi responsável por altas taxas de mortalidade (LAVIER e GARMAN, 2002; NEUMANN et al., KAWAOKA, 2009; WRIGHT et al., 2007). O vírus detectado em 1977 se assemelhava geneticamente muito com o vírus que havia circulado no início da década de 50, sugerindo uma liberação acidental a partir de laboratórios de microbiologia que guardavam o vírus. O reaparecimento do vírus H1N1 não substituiu os vírus H3N2 circulantes até o momento, e ambos co-circularam em seres humanos até a emergência do vírus A H1N1 em 2009 (NEUMANN et al., KAWAOKA, 2009).

De fato, foi em 2009 que o século XXI experimentou a sua primeira pandemia provocada pelo vírus *Influenza A*, desta vez pelo subtipo H1N1 de origem suína. No dia 11 de junho de 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) elevou o alerta pandêmico de nível 5 para o nível 6, o que caracterizava, segundo seus critérios, que a pandemia estava acontecendo. Com a propagação do vírus pandêmico, muitos países deixaram de fazer diagnósticos em pacientes com quadro

respiratório leve ou moderado, concentrando os esforços nos pacientes com quadro grave ou pacientes pertencentes aos chamados grupos de risco para doença severa. Portanto, segundo os dados epidemiológicos divulgados pela OMS, consta que houve mais de 504.000 casos confirmados de gripe pelo vírus *Influenza A* (H1N1) de origem suína no mundo, com total de mortes de no mínimo 18.000. A região mais afetada foi a das Américas com aproximadamente 191.000 casos confirmados e 4.500 óbitos (WHO, 2010). No Brasil, a pandemia foi dividida em duas fases epidemiológicas e operacionais distintas: fase de contenção e fase de mitigação (BRASIL, 2010a).

#### 4.8- EPIDEMIOLOGIA

##### 4.8.1- AS AVES COMO HOSPEDEIROS NATURAIS DO VÍRUS *Influenza*

Os primeiros estudos sobre os vírus *Influenza* em aves migratórias estabeleceram os princípios da ecologia da gripe em seus reservatórios naturais. Até poucas décadas atrás, mínima atenção era dada à gripe nestas aves. Somente após o surgimento de vírus aviário com importância para a saúde animal e humana é que se percebeu que as aves são a fonte original do vírus da gripe e que grandes epizootias podem acontecer com potencial risco de transposição de barreira de espécies e geração de pandemias em seres humanos (Figura 5). Frente a isto, diversos países passaram a monitorar as aves selvagens, em especial as migratórias, seguindo as rotas de migração das mesmas (ALEXANDER, 2000).



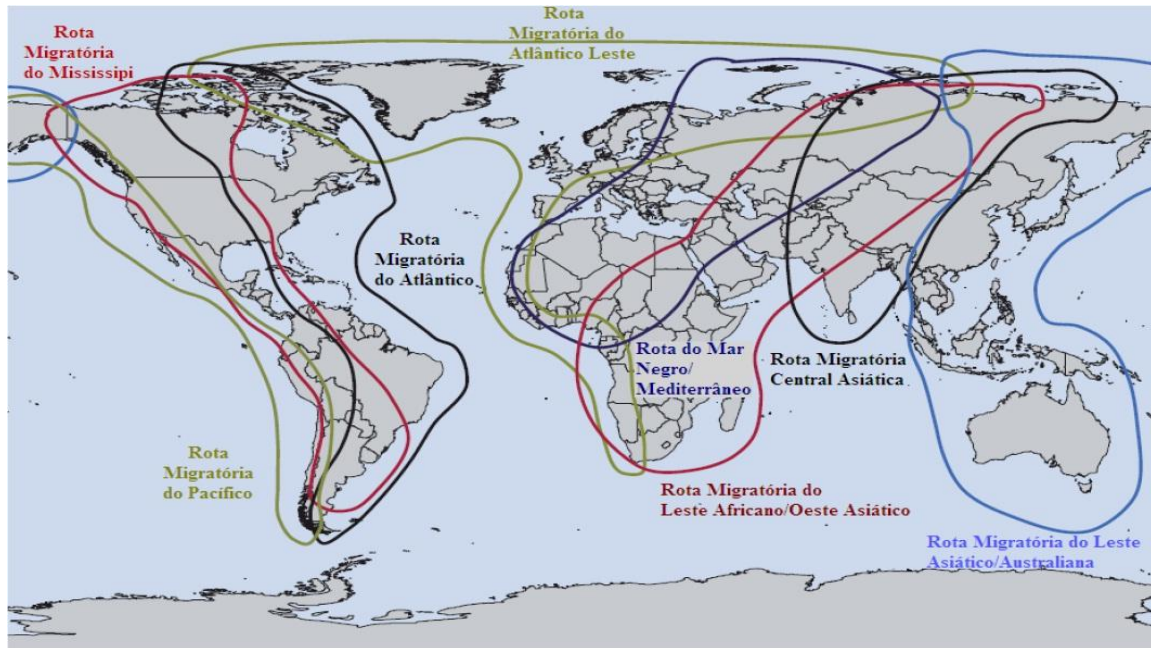
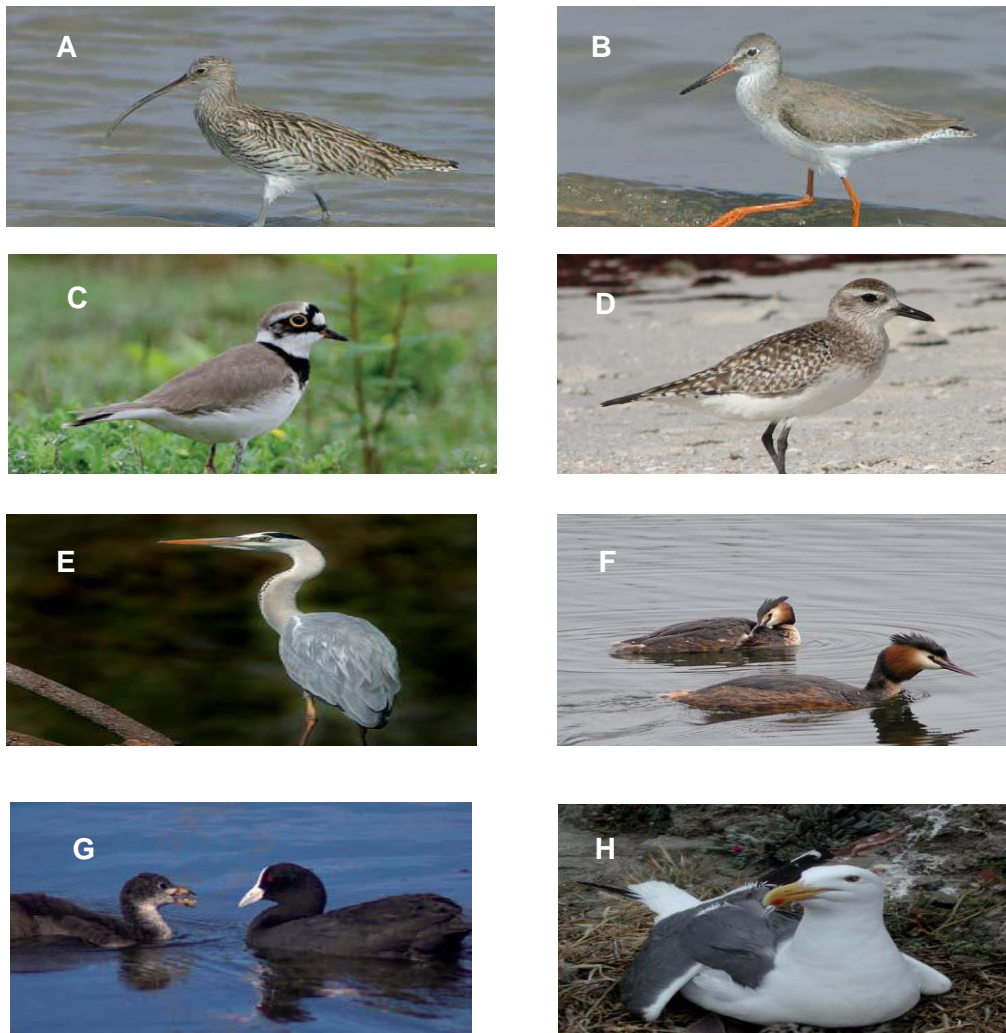


Figura 5: Rotas usadas por espécies de aves migratórias. *Food and Agriculture Organization (FAO)*, acessado em 25/03/2013 <http://www.fao.org/avianflu/en/maps.html>.

Aproximadamente, cerca de 90 espécies de aves pertencentes a 12 ordens distintas são susceptíveis ao vírus *Influenza*, apresentando ou não sintomas da infecção. A grande maioria dos isolamentos virais tem sido obtidas de aves aquáticas (*Anseriformes*) que compreendem patos e marrecos, entre outros, e também espécies da ordem *Charadriiformes* (gaivotas e aves marinhas). Estas variedades de aves são, portanto, portadores de toda a variedade de subtipos de vírus da gripe e, portanto, constituem, muito provavelmente, o reservatório natural de todos os vírus da gripe A (Figura 6) (ALEXANDER, 2000; FOUCHIER, 2004; WIDJAJA et al., 2004).



**Figura 6: Aves Anseriforms (A [*Numenius arquata*], B [*Tringa totanus*], C [*Charadrius dubius*] e D [*Anous stolidus*]) e Charadriiformes (E [*Ardea cinerea*], F [*Podiceps cristatus*], G [*Fulica atra*] e H [*Larus occidentalis*]). Adaptado de FAO *animal production and health* 2007, acesado em <http://www.fao.org/AVIANFLU/en/wildlife/index.html>.**

O vírus de gripe aviária, em geral, não causa doença em seus hospedeiros naturais. Em vez disso, os vírus apresentam baixas alterações evolutivas, observado na forma molecular que apresenta baixos índices de mutação. Nesse sentido, hospedeiro e vírus parecem existir em um estado de tolerância mútua, meticulosamente equilibrado, clinicamente demonstrado pela ausência de doença; entretanto, a replicação viral persiste de forma eficiente (TAUBENBERGER, 2005).

Quando transmitida para as espécies de aves altamente vulneráveis, especialmente as aves domésticas (galinha, pato e peru), geralmente a infecção produz doença com sintomas leves é causada por vírus referidos como de Gripe Aviária de Baixa Patogenicidade (GABP), os quais, em geral, só causam um ligeiro e transitório declínio na produção de ovos ou uma redução no ganho de peso em aves de engorda (CAPUA e MUTINELLI, 2001).

Tal cenário pode ser produzido por diversos subtipos de hemaglutinina. No entanto, as cepas virais que contenham os subtipos H5 e H7 têm o potencial de evoluir para uma forma altamente patogênica conhecida como Gripe Aviária de Alta Patogenicidade (GAAP). Isso pode ocorrer, especialmente após transmissão e adaptação dos subtipos H5 e H7 as novas espécies de aves e consequente novos hospedeiros (WEBSTER, 1998). Uma vez o fenótipo de GAAP esteja estabelecido em aves domésticas, pode ocorrer transmissão horizontal destas de volta para a população de aves selvagens. A vulnerabilidade das aves selvagens para a doença induzida pelo GAAP parece variar grosseiramente de acordo com a espécie, idade e cepa viral (CAPUA e MUTINELLI, 2001).

#### 4.8.2- A GRIPE AVIÁRIA

A gripe aviária é uma doença infectocontagiosa entre aves, causada pelo vírus *Influenza A*. De fato, apenas os vírus da gripe de tipo A são conhecidos por causar infecções naturais em aves, nas quais encontram-se todas as combinações possíveis entre diferentes espécies moleculares de HA e NA (ALEXANDER, 2000; WRIGHT et al., 2007; ALEXANDER 2008).

Em determinadas ocasiões, o vírus *Influenza* pode atravessar a barreira das espécies e causar doença em aves domésticas, seres humanos e outros mamíferos. Nessa situação, a doença é considerada uma zoonose (ALEXANDER 2008; WRIGHT et al., 2007; SWAYNE e HALVORSON 2008).

A especificidade por espécie animal é determinada, principalmente, pela glicoproteína de ligação HA, a qual liga-se em resíduos de ácidos siálicos (AS) da superfície celular do hospedeiro. Os vírus *Influenza* que infectam humanos reconhecem, preferencialmente, receptores com sacarídeos que terminam em AS $\alpha$  2,6 ligado a galactose (Gal). Tais receptores são expressos essencialmente em células epiteliais da traquéia e brônquios. Os vírus aviários e equinos, por sua vez, reconhecem receptores terminando em AS $\alpha$  2,3 Gal, localizados, principalmente, em epitélio traqueal e células intestinal desses animais, respectivamente (ROGERS e PAULSON, 1983; WRIGHT et al., 2007).

O gene que codifica a HA também é o principal determinante da virulência do vírus da gripe aviária (WRIGHT et al., 2007; SWAYNE e HALVORSON, 2008). A clivagem da proteína HA0 em HA1 e HA2 é essencial para a infecciosidade do vírus.

Em situações de GAAP, o sítio de clivagem da HA tem múltiplos aminoácidos básicos (Q-R/K-X-R/K-R, onde X é um aminoácido ácido) que podem ser reconhecidos e clivados por proteases ubíquas como a furina presentes em diversos tecidos e sistemas. Isso favorece a disseminação viral além do trato respiratório/intestinal, causando doença grave e geralmente fatal (STIENEKE-GROBER et al., 1992; WRIGHT et al., 2007; SWAYNE e HALVORSON, 2008).

Em casos de GABP, a HA0 apresenta sitio de clivagem monobásico e é clivada apenas por proteases tipo tripsina, que estão presentes em locais específicos, tais como aparelho respiratório e digestivo e, conseqüentemente, os sinais clínicos são limitados a estas localizações (STEINHAUER 1999; WRIGHT et al., 2007; SWAYNE e HALVORSON, 2008).

Devido as diferenças na especificidade da HA ao receptor e da diversidade dos mesmos nos diferentes animais pensava-se que a gripe aviária não poderia causar infecção em humanos. No entanto, esse pensamento mudou a partir do episódio do surto de gripe aviária em humanos ocorrido em Hong Kong no ano de 1997, quando foram comprovados 18 casos, dos quais seis fatais. Estudos nos últimos 10 anos demonstraram que a capacidade de vírus aviário infectar humanos se deve a presença de uma pequena população de células ciliadas presente na em bronquíolos e alvéolos pulmonares que contêm oligossacarídeos AS $\alpha$  2,3 Gal. (SWAYNE e HALVORSON, 2008).

A transmissão do vírus *Influenza A* das aves para os seres humanos também pode estar associada com a capacidade da HA mudar a sua preferência de AS $\alpha$  2,3 Gal para AS $\alpha$  2,6 Gal (MATROSOVICH et al., 2004; SHINYA et al., 2006; YAMADA et al., 2006). Neste sentido, os suínos podem exercer um papel importante de hospedeiro intermediário. De fato, eles apresentam em seu epitélio respiratório células que expressam tanto AS $\alpha$  2, 3 Gal quanto AS $\alpha$  2, 6 Gal, o que o torna suscetível a se infectar por vírus *Influenza* de diversas origens aviária, humana e outros animais, sendo, portanto, considerado como o hospedeiro facilitador de rearranjos genéticos, o que leva ao surgimento de novos subtipos virais (WRIGHT et al., 2007).

Em março de 1999, um subtipo relacionado a gripe aviária infectou pessoas em Hong Kong. Identificado como sendo um vírus Influenza A (H9N2), foi responsável por raros casos brandos de gripe. Os vírus A H9N2, não são capazes

de serem transmitidos de uma pessoa a outra, eles infectam o homem diretamente do reservatório aviário (KATZ, 2009).

No início de 2003, na Holanda, outro subtipo viral de origem aviária, o H7N7, ainda não havia sido encontrado em seres humanos até então. Mas naquele ano foi detectado em 89 pessoas, a maioria dos infectados apresentaram um quadro de conjuntivite. No entanto, duas pessoas desenvolveram um quadro respiratório com sintomatologia característica de gripe e uma foi a óbito devido a complicações pulmonares (FOUCHIER et al., 2004). Atualmente, são conhecidos trinta e três subtipos de IA e, periodicamente, novos subtipos são descritos (Quadro 2).

Nº	Subtipo HA	Subtipo NA	Vírus <i>Influenza A</i> Isolados
01	H1	N1	A/pato/Alberta/35/76(H1N1)
02	H1	N8	A/pato/Alberta/97/77(H1N8)
03	H2	N9	A/pato/Alemanha/1/72(H2N9)
04	H3	N8	A/pato/Inglaterra/62(H3N8)
05	H3	N2	A/peru/Inglaterra/69(H3N2)
06	H4	N6	A/pato/Tchecoslováquia/56(H4N6)
07	H4	N3	A/pato/Alberta/300/77(H4N3)
08	H5	N3	A/Andorinha/África do sul/300/77(H5N3)
09	H5	N4	A/pato/Etiópia/300/77(H5N4)
10	H5	N9	A/peru/Ontário/7732/66(H5N9)
11	H5	N1	A/pintinho/Escócia/59(H5N1)
12	H6	N2	A/peru/Massachusetts/3740/65(H6N2)
13	H6	N8	A/peru/Canada/63(H6N8)
14	H6	N5	A/pardela/Australia/72(H6N5)
15	H6	N6	A/galinha/Etiópia/73(H6N6)
16	H6	N1	A/pato/Alemanha/1868/68(H6N1)
17	H7	N7	A/aves/Holanda/27(H7N7)
18	H7	N1	A/galinha/Brescia/1902(H7N1)
19	H7	N9	A/galinha/China/2013(H7N9)
20	H7	N3	A/peru/Inglaterra/639H7N3)
21	H7	N1	A/aves/Rostock/34(H7N1)
22	H8	N4	A/peru/Ontario/6118/68(H8N4)
23	H9	N2	A/peru/Wisconsin/1/66(H9N2)
24	H9	N6	A/pato/Hong Kong/147/77(H9N6)
25	H9	N8	A/galinha/Malawi/149/77(H9N8)
26	H9	N7	A/peru/Escócia/70(H9N7)
27	H10	N8	A/codorna/Itália/1117/65(H10N8)
28	H11	N6	A/pato/Inglaterra/56(H11N6)
29	H11	N9	A/pato/Memphis/546/74(H11N9)
30	H12	N5	A/pato/Alberta/60/76/(H12N5)
31	H13	N6	A/gaivota/Maryland/704/77(H13N6)
32	H14	N4	A/pato/Gurjev/263/83(H14N4)
33	H15	N9	A/pardela/Australia/2576/83(H15N9)

Quadro 2: Subtipos de *Influenza A* Aviária. Fonte: Adaptado de UNGCHUSAK et al., 2005.

#### 4.8.3- PATOGÊNESE DA GAAP

A patogenicidade do vírus *Influenza A* tem contribuição poligênica e depende, em grande parte, de uma variedade de genes e tropismo tecidual que podem interferir tanto na eficácia da replicação viral, como nos mecanismos de evasão do sistema imunológico, entre outros. A forma altamente patogênica da gripe aviária foi causada até agora pelos vírus *Influenza A* dos subtipos H5 e H7 exclusivamente. No entanto, apenas alguns representantes desses subtipos, de fato, mostram um biotipo altamente patogênico (SWAYNE e SUAREZ, 2000a).

Normalmente, os vírus H5 e H7 são mantidos de forma estável em seus hospedeiros naturais causando baixa patogenicidade. Deste reservatório, o vírus pode ser introduzido por várias vias em criadouros de aves. Após um período variável de circulação e, presumivelmente, adaptação em populações de aves mais suscetíveis a infecção, esses vírus podem sofrer mutações e/ou introduzirem inserções nucleotídicas que serão responsáveis por codificarem os sítios multibásicos de clivagem da HA0, o que tornará a cepa altamente patogênica (TAUBENBERGER 2005). Isto constitui-se o principal determinante da virulência do vírus da gripe aviária (WRIGHT et al., 2007; SWAYNE e HALVORSON, 2008)

Este processo tem sido documentado no campo em várias ocasiões. Na Itália, por exemplo, um vírus H7N1 de baixa patogenicidade circulou na população de perus e frangos durante vários anos e, em dezembro de 1999, foi detectado um vírus da GAAP H7N1, com extrema semelhança genética do seu precursor, tendo diferença apenas no seu local de clivagem, quando surgiu um multibásico responsável por maior disseminação viral e quadro clínico mais grave (CAPUA 2000).

Existem, no entanto, cepas virais altamente patogênicas cuja sequência de nucleotídeos que codifica o local de clivagem da HA não apresenta padrão para codificar o sítio multibásico. Um exemplo disso é o vírus H7N3 de alta patogenicidade que surgiu através de rearranjo de segmentos gênicos, mas exibindo sítio de clivagem monobásico da HA, semelhante ao que se encontra nas cepas de baixa patogenicidade. Também existem exemplos comparáveis para a linhagem H5 (SUAREZ 2004).

O contrário também pode ocorrer. Em uma cepa de H5N2 isolada no Texas e classificada como de baixa patogenicidade, foi verificada a sequência de

consenso do local de clivagem de GAAP com a presença do sítio multibásico (LEE, 2005). Estes dados re-enfatizam a natureza poligênica e intrigante da patogenicidade do vírus da gripe.

#### 4.8.4- O VÍRUS *Influenza A H5N1*

A gripe aviária ganhou atenção mundial quando uma cepa altamente patogênica do subtipo A H5N1 ganhou *status* de enzoótica em aves domésticas em todo o sudeste da Ásia e que provavelmente surgiu antes de 1997 no sul da China, (PERKINS e SWAYNE 2003). Apesar de não ser um evento totalmente inédito, o número substancial de casos documentados em seres humanos, associado com doença grave e muitas mortes levantou sérias preocupações sobre o potencial pandêmico deste vírus (KLEMPNER e SHAPIRO 2004; KAYE e PRINGLE, 2005; WEBSTER, 2005).

O vírus *Influenza A (H5N1)* foi isolado e caracterizado a partir de uma amostra colhida de um ganso doméstico na província de Guangdong, sul da China em 1996. No ano seguinte, a primeira epizootia de GAAP pelo vírus A H5N1 em aves domésticas foi descrito em Hong Kong, o que resultou no abate de mais de 1,5 milhões de frangos, em um esforço para conter e eliminar a doença. Este evento levou à infecção de 18 pessoas com seis óbitos, os quais se constituíram os primeiros casos documentados de mortes em humanos causados pelo vírus (GAUTHIER-CLERC et al., 2007; BROWN et al., 2008).

Em fevereiro de 2003, surgiram dois novos casos de infecção pelo vírus H5N1 documentados em membros de uma família de Hong Kong que havia viajado recentemente para a república popular da China. Um terceiro membro da família morreu de doença respiratória grave, mas não foram colhidas amostras clínicas para confirmar se o vírus A H5N1 foi o responsável pelo óbito (GILBERT et al., 2006; GAUTHIER-CLERC et al., 2007).

Em dezembro de 2003 e janeiro de 2004, tigres cativos (*Panthera tigris*) e leopardos (*Panthera pardus*) de um zoológico da Tailândia, foram alimentados com carcaças de frango, e diagnosticados com o vírus. Rapidamente, o vírus A H5N1 foi descrito infectando aves domésticas em oito países do sudeste Asiático (Camboja, Taiwan, Indonésia, Japão, Coreia, Laos, Tailândia e Vietnã). Esta onda de infecções nos animais resultou no abate de pelo menos 45 milhões de aves comerciais. Até

março de 2004, outros 35 casos de infecção em humanos foram relatados no Vietnã e na Tailândia, dos quais 24 de evolução fatal (GILBERT et al., 2006; GAUTHIER-CLERC et al., 2007).

Subsequentes registros de A H5N1 em aves comerciais foram verificados no sudeste asiático, com casos humanos se disseminando pelo Vietnã, Tailândia, Camboja, Indonésia e China. Epidemiologicamente, ficou claro que a maioria dos casos humanos envolveu contato com aves infectadas ou materiais contaminados, mas alguns possíveis casos de transmissão de pessoa a pessoa não foram descartados (GILBERT et al., 2006; VAN GILS et al., 2007).

Em maio de 2005, ocorreu um evento de mortandade causado pelo vírus H5N1 em mais de seis mil aves aquáticas no lago Qinghai, reserva natural nacional, no noroeste da China. Estimativas indicam que entre 5-10% da população do mundo inteiro de gansos *Bar-headed* foram mortos durante este período. Este foi o segundo evento de mortandade de aves migratórias documentado como sendo resultado de infecção por um vírus da gripe aviária. O primeiro foi registrado em 1961, quando inúmeras andorinhas (*Sterna hirundo*) morreram devido infecção pelo vírus H5N1 na África do Sul (YASUÉ et al., 2006; BROWN et al., 2008).

O evento de mortandade pelo vírus aviário H5N1 relacionado ao lago Qinghai e surtos posteriores na China, Sibéria, Cazaquistão e Mongólia em julho e agosto de 2005 sinalizou uma significativa expansão geográfica da infecção. Com o padrão de propagação da doença estabelecido, ficou evidente o papel das aves migratórias, principalmente, as aquáticas, na transmissão do vírus (GAUTHIER-CLERC et al., 2007).

Em janeiro de 2006, as primeiras infecções humanas pelo H5N1 foram relatadas fora da Ásia, mais precisamente na Turquia. Dentro de alguns meses, infecções em seres humanos também foram relatadas no Iraque, Azerbaijão, Egito e Djibuti, elevando para dez o número de países que notificaram infecções pelo vírus aviário em questão. Assim como na Ásia, na maioria desses países, os casos em humanos foram associados com a manipulação de aves domésticas infectadas. A primeira vítima fatal nessa região foi registrada em março de 2006 no Azerbaijão, a qual foi infectada após enterrar um cisne morto pela doença (YASUÉ et al., 2006).

Desde então, o H5N1 não parou de causar infecções em humanos e até o dia 24 de janeiro de 2014, última atualização da Organização Mundial de Saúde (OMS), já havia sido contabilizados 650 casos de infecção humana por este vírus,



com 386 mortes, o que representa uma taxa de letalidade de aproximadamente 60%. E até a presente data, 16 países já notificaram casos da doença por H5N1 em seres humanos (WHO, 2013).

Atualmente, considera-se o H5N1 como endêmico na Ásia e África, em especial no Egito. Estes vírus encontram um nicho ecológico em aves domésticas e apesar de ser difícil a transmissão para seres humanos, a exposição constante dos trabalhadores rurais e nos mercados asiáticos e africanos que comercializam aves vivas e as abatem *in loco*, eleva a chance da ocorrência de uma adaptação dos vírus aviários aos humanos e, assim, tornando-se mais eficientes na transmissão de pessoa a pessoa, o que poderia ocasionar uma nova pandemia. Por este motivo, é importante o monitoramento de aves selvagens e domésticas para a contenção dos focos aviário da doença (BROWN et al., 2008).

#### 4.8.5- TRANSMISSÃO, DISTRIBUIÇÃO E DISSEMINAÇÃO

As aves aquáticas selvagens são o reservatório natural para a gripe aviária (DE MARCO et al., 2003; WRIGHT et al., 2007; SWAYNE e HALVORSON, 2008). Nelas, em geral, os vírus *Influenza* não causam sinais da doença, se replicam no trato intestinal e são transmitidos através das fezes (WEBSTER, 1997). Em aves a transmissão é feita pela via fecal-oral por meio de água contaminada (WEBSTER, 1997).

Em seu hospedeiro natural o vírus é submetido a eventos de mutação limitados, indicando que eles estão adaptados a seus reservatórios naturais (WEBSTER et al., 1995). No entanto, quando transmitidos a outro hospedeiro como as aves domésticas, seres humanos ou outros mamíferos, eles rapidamente sofrem mutação nucleotídica com repercussão antigênica, o que pode resultar no aumento da virulência e infecções mais severas (WEBSTER et al., 1995). A introdução primária de vírus da gripe aviária, em uma população de aves, depende do contato com aves silvestres, seja através de fontes de água contaminadas, contato direto ou fômites (ALEXANDER 2008; SWAYNE e HALVORSON 2008). Cepas com maior virulência podem mostrar menor capacidade de transmissão do que vírus de baixa patogenicidade tanto em infecções naturais, quanto experimentais. Uma das razões sugeridas para esta observação é que os vírus altamente patogênicos rapidamente matam o hospedeiro resultando na baixa excreção do vírus (ALEXANDER, 2008).

A infecção humana por vírus da gripe aviária ocorre, principalmente, devido ao contato próximo com aves infectadas, especialmente através do contato direto com as excretas de aves e mucosas com secreções contaminadas (KOOPMANS et al., 2004; TRAN et al., 2004; HAYDEN e CROISIER 2005). Pessoas envolvidas no processamento das aves para consumo têm sido ocasionalmente infectadas. O vírus também pode entrar via trato respiratório ou conjuntiva (FOUCHIER et al., 2004).

A transmissão de pessoa a pessoa pode ocorrer com baixa eficiência, mas com maior possibilidade durante a fase inicial da infecção (KOOPMANS et al., 2004; UNGCHUSAK et al., 2005).

#### 4.8.6- SINAIS CLINICOS DA GRIPE EM AVES

Após um período de incubação de geralmente alguns dias (mas raramente até 21 dias), e dependendo das características da cepa, da dose de inoculo, da espécie e idade da ave, a apresentação clínica da gripe aviária é variável e os sintomas são bastante inespecíficos (ELBERS, 2005). Assim, um diagnóstico baseado apenas na apresentação clínica é impossível.

Em aves comerciais, a gripe aviária altamente é patogênica determina elevada morbimortalidade, causando doença sistêmica que revela necrose e inflamação em diversos órgãos (SWAYNE e HALVORSON 2008; PANTIN-JACKWOOD e SWAYNE 2009). A GABP afeta, principalmente, o sistema respiratório e é caracterizada por inflamação aguda do trato respiratório (SWAYNE e HALVORSON 2008). Pouco ou nenhum vírus é encontrado em outros órgãos, exceto os órgãos reprodutivos, o que pode resultar em ovos deformados e lesões no ovário. Por outro lado, a GAAP produz lesões em vários órgãos caracterizados por edema, congestão e hemorragia dos pulmões, edema do cérebro, miocardite, pancreatite, depleção linfóide, hiperplasia fagocitária, necrose e hemorragia da bursa e timo, edema subcutâneo, necrose da medula óssea, degeneração do músculo esquelético, necrose hepatocelular, necrose tubular e nefrite intersticial (PANTIN-JACKWOOD e SWAYNE 2009).

#### 4.8.7- SINAIS CLINICOS DA GRIPE AVIARIA EM SERES HUMANOS

Depois de um curto período de incubação de 1-4 dias, o início da doença é geralmente abrupto, com sintomas sistêmicos típicos: febre alta e calafrios, mal estar geral, cansaço extremo e fraqueza, dano alveolar difuso, fibrose intersticial, hiperplasia de pneumócitos tipo II, hemorragia, pleurite. Também há registros de lesões em outros órgãos; no fígado a infecção provoca necrose lobular central, micro-vesicular, colestase (redução do fluxo biliar) e atividade hemofagocítica. Nos rins observa-se necrose tubular aguda, edema cerebral, hemofagocitose reativa, congestionamento e depleção de linfócitos no baço e medula óssea hipoplásica ou hiperplásica (KORTEWEG e GU, 2008). Entre as crianças, a otite média, náuseas e vômitos também são comuns (WRIGHT et al., 2007; KORTEWEG e GU, 2008).

#### 4.8.8- A *Influenza* AVIÁRIA COM IMPORTÂNCIA PARA ECONOMIA

Além do problema de risco para a saúde humana, os vírus da gripe aviária de alta ou baixa patogenicidade podem ocasionar grandes prejuízos econômicos. Quando um vírus de alta patogenicidade é encontrado em uma granja, todas as aves devem ser sacrificadas para a contenção da epizootia. Com isso, as exportações de carne e outros insumos derivados de aves de granja são completamente paralisados. Dentro do “*ranking*” dos maiores produtores de frango, o Brasil está em terceiro lugar, atrás apenas dos Estados Unidos e China. No entanto, entre os exportadores, o Brasil ocupa a primeira posição sendo o maior exportador de carne de frango do mundo desde 2004, sendo responsável por 43,4% de toda a exportação mundial, segundo dados da União Brasileira de Avicultura (MORAES, 2010).

Apesar do Brasil não possuir relatos de contágio de gripe aviária, considerado um evento raro, em aves comerciais e em seres humanos, a falta de monitoramento e planejamento para eventuais casos é bastante crítica, o que deixa em extrema vulnerabilidade para ocorrência de epizootias.

Desde 1955, mais de 24 epizootias documentadas de GAAP ocorreram em todo o mundo, resultando na morte de milhões de aves (PERDUE e SWAYNE 2005). Um surto de GAAP ocorreu na Holanda em 2003, causada pelo subtipo H7N7, que durou menos de três meses e resultou no abate de mais de 30 milhões

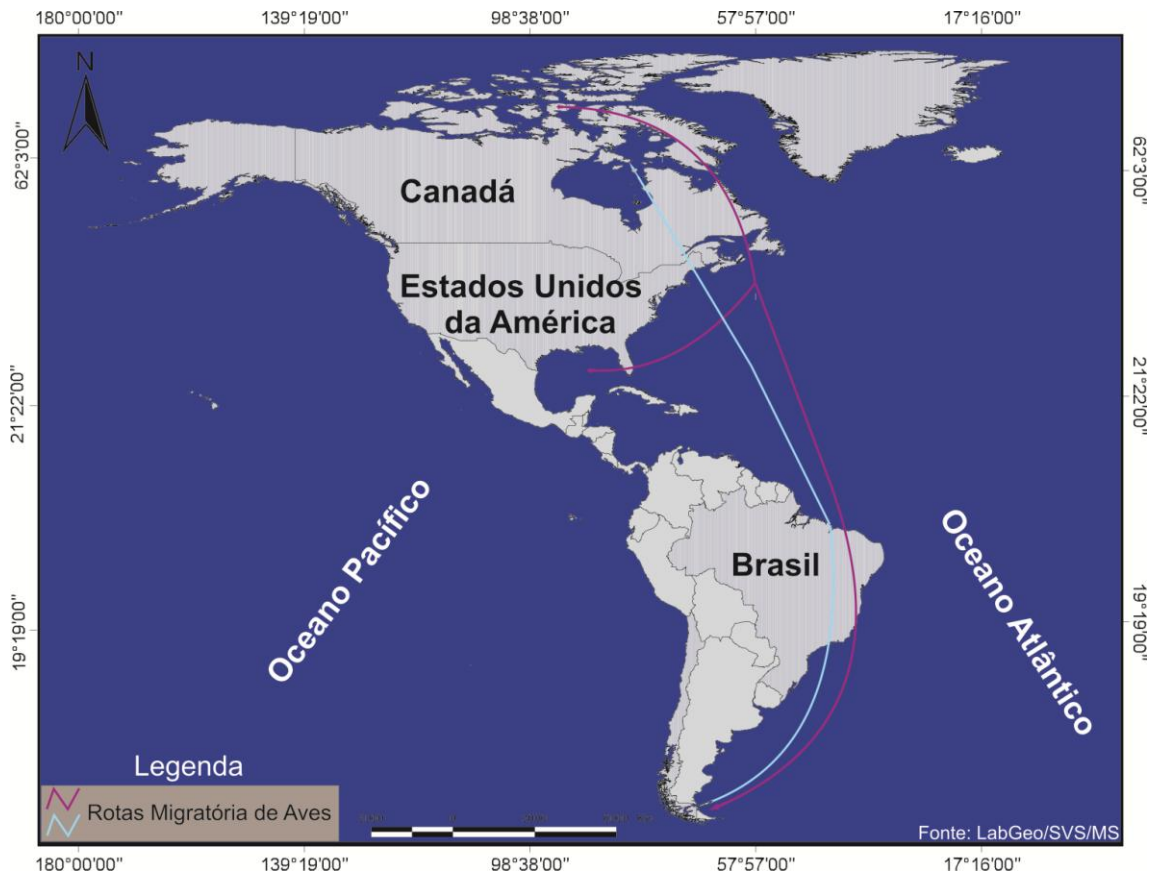
de aves (VAN RIEL et al., 2009). Da mesma forma, mais de 13 milhões de aves foram infectadas pelo vírus da GAAP H7N1 na Itália, em 1999, que inicialmente surgiu como GABP (CAPUA et al., 2000). Em 2004, um vírus GAAP H7N3 surgiu a partir de um vírus GABP em British Columbia, resultando na eliminação de 19 milhões de aves (TWEED et al., 2004).

Até meados de 2007 foram notificados 4.465 focos epizoóticos em aves comerciais em 36 países, o que explica e justifica a grande capacidade de disseminação do vírus *Influenza* entre aves (VAN RIEL et al., 2009).

Frente a isto, diversos países passaram a realizar o monitoramento das aves selvagens, em especial as aves migratórias, seguindo as rotas de migração das mesmas (Figura 5) (VAN RIEL et al., 2009).

Muitas aves que procriam no Brasil, migram para outras localidades nos períodos de descanso reprodutivo. Isto pode favorecer a disseminação de vírus *Influenza* para várias populações não migratórias do Brasil e países vizinhos. Da mesma forma várias aves que procriam em outros países, migram para o Brasil em busca de alimento (SICK, 2001).

No Brasil, foram catalogadas cerca de 150 espécies de aves que visitam o país regularmente em bandos, ou são vistas esporadicamente em nosso território, sendo que 101 espécies são aquáticas, constituindo o principal reservatório do vírus *Influenza*. Dentre as espécies que visitam o Brasil e que se reproduzem no país, 91 são oriundas do hemisfério norte, sendo 54 delas espécies aquáticas. Outras 61 espécies que chegam ao Brasil são provenientes de países do hemisfério sul e da Antártica, das quais 46 espécies são aquáticas (SICK, 2001). A rota migratória do Atlântico e do Mississipi passa pela região ártica e segue em direção ao interior do país (Figura 7).



**Figura 7: Principais rotas migratórias usadas por aves selvagens para realizar o processo natural de migração. Fonte: Instituto Evandro Chagas, laboratório de Geoprocessamento.**

## 5 - MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 - TIPO DE ESTUDO

Transversal, retrospectivo e analítico.

### 5.2 - ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

Este projeto foi elaborado obedecendo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo animais. Foi submetido a comissão de ética no uso de animais - CEUA do Instituto Evandro Chagas (IEC) com parecer favorável, conforme o número de registro: 0011/2012 protocolo nº: 013/2012/CEUA/IEC/SVS/MS (Anexo 1).

### 5.3 - ASPECTOS DE BIOSSEGURANÇA

Os procedimentos de manipulação e processamento das amostras biológicas foram desenvolvidos em laboratório de Nível de Biosegurança 3 (NB3) de acordo com o preconizado pela OMS.

### 5.4 - ÁREA DE ESTUDO

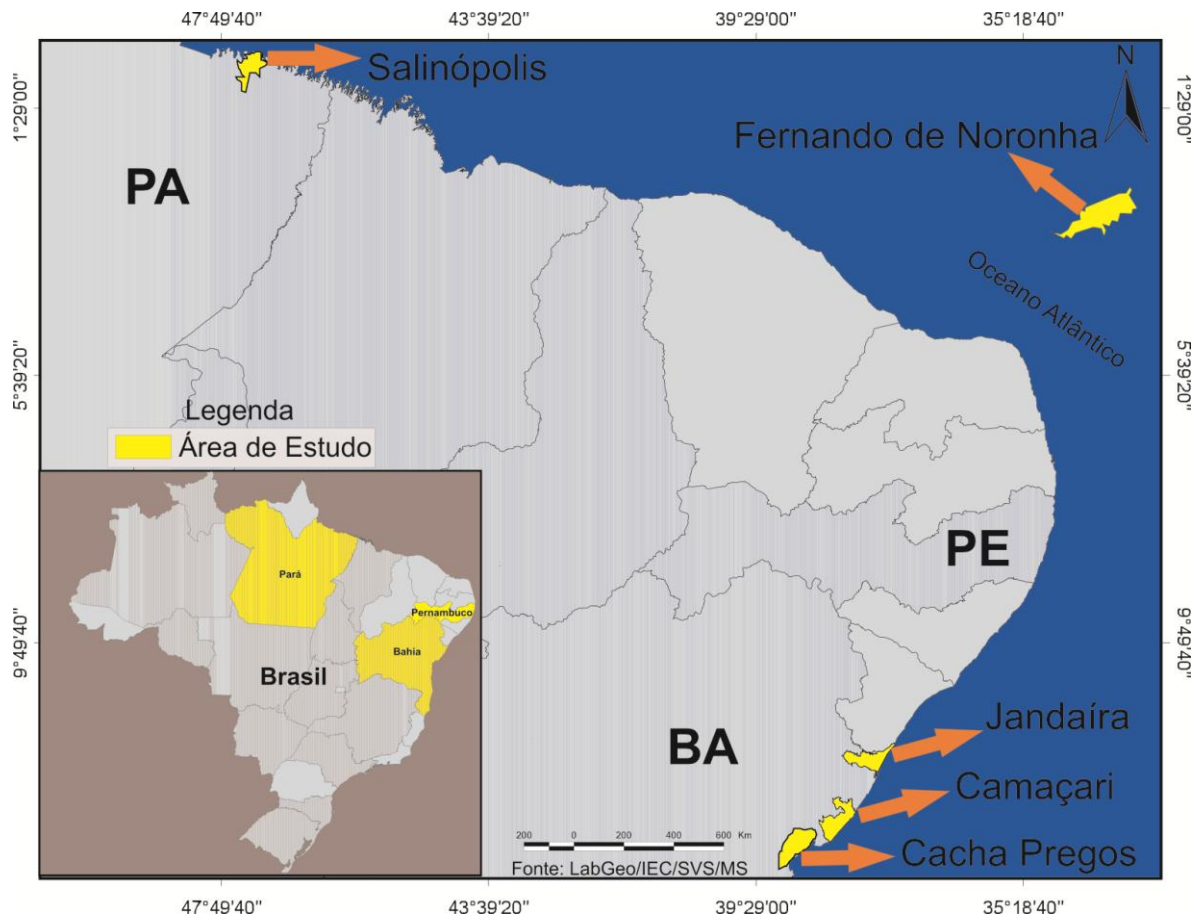
As amostras coletadas durante este estudo estão resumidas na tabela 1. Entre os anos de 2006 (julho e novembro) e 2007 (março e abril) foram coletadas 1.351 e 901 amostras, respectivamente, totalizando 2.252 amostras, obtidas a partir de uma variedade de espécies de aves em regiões litorâneas dos estados da Bahia (Jandaíra [Camaçari, Cacha Pregos, Cetrel]), Pará (Salinópolis) e Pernambuco (Fernando de Noronha [Açude dos Xaréus, Hotel de trânsito, Ilha da rata, Ilha do meio, Morro da viuvinha, Usina de Campostagem]) (Figura 8).

No estado de Pernambuco, especificamente na ilha de Fernando de Noronha, foram coletadas 394 amostras divididas nas seguintes sub-regiões: Açude dos Xaréus (n= 13), Hotel de trânsito (n= 43 amostras), Ilha da rata (n= 80), Ilha do meio (n= 167), Morro da viuvinha (n= 56), Usina de campostagem (n= 35). Na Bahia foram coletadas 1515 amostras, sendo estabelecido quatro áreas de abrangência

Jandaíra (Ilha da sogra) com (n= 1279), Camaçari (n= 201), Cacha pregos (Ilha do amor) (n=21) e Nova Viçosa (n= 14). No Pará foram coletadas na região de Salinópolis (n= 413) (Quadro 3).

**Tabela 1: Distribuição das amostras de swab coletadas em 2006 e 2007 nos estados da Bahia, Para e Pernambuco.**

Ordem	Nome científico	Nome popular	n	Total
Charadriiformes	<i>Actitis macularius</i>	Maçarico-maculado	86	1604
	<i>Anous minutus</i>	Trinta-réis-preto	2	
	<i>Anous stolidus</i>	Viuvinha marrom	9	
	<i>Arenaria interpres</i>	Rola-do-mar	14	
	<i>Calidris Alba</i>	Maçarico-branco	2	
	<i>Calidris canutus</i>	Maçarico-de-papo-vermelho	1	
	<i>Calidris minutilla</i>	Maçarico-de-rabadilha-branca	31	
	<i>Calidris pusilla</i>	Maçarico-rasteirinho	110	
	<i>Chadrius collaris</i>	Batuíra-de-coleira	26	
	<i>Charadrius semipalmatus</i>	Batuira de bando	12	
	<i>Charadrius wilsonia</i>	Batuíra-bicuda	2	
	<i>Pluvialis squatarola</i>	Tarambola-cinzenta	8	
	<i>Rynchops Níger</i>	Talha mar	1	
	<i>Sterna Eurygnatha</i>	Trinta-réis-de-bico-amarelo	18	
	<i>Sternula antillarum</i>	Trinta-réis-miúdo	48	
	<i>Sterna dougallii</i>	Gaivina-rosada	595	
	<i>Sterna Fuscata</i>	Trinta-reis-das-rocas	48	
	<i>Sterna hirundo</i>	Garajau-comum	581	
<i>Sterna superciliaris</i>	Trinta-réis-anão	9		
<i>Tringa melanoleuca</i>	Maçarico-de-perna-amarela	1		
Anseriformes	<i>Añas bahamensis</i>	Marreca toicinho	4	277
	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	Marreca-cabocla	38	
	<i>Dendrocygna viduata</i>	Irere	235	
Passeriformes	<i>Himantopus palliatus</i>	Piru-piru	1	12
	<i>Elaenia spectabilis</i>	Cucuruta,	10	
	<i>Pitango sufhoratus</i>	Bem-te-vi	1	
Columbiformes	<i>Vireo glacilirosttis</i>	Cebito	24	48
	<i>Zenaida auriculata</i>	Avoante ou Arribação	19	
	<i>Colombina passerina</i>	Rolinha-cinzenta	5	
Pelecaniformes	<i>Bubucus íbis</i>	Garça vaqueira	40	40
Suliformes	<i>Fragata magnificens</i>	Fragata ou tesourão	2	271
	<i>Sula dactylatra</i>	Atobá mascarado	231	
	<i>Sula leucogaster</i>	Atobá marrom	20	
	<i>Sula sula</i>	Mumbebo real do pé vermelho	18	



**Figura 8: Território Brasileiro com demarcação das localidades onde ocorreram as capturas e coleta de material das aves.**

### 5.5- COLETA DAS AMOSTRAS

Durante as excursões realizadas para a pesquisa, foram coletadas amostras biológicas de aves migratórias em regiões que apresentam critérios que as definem como áreas de risco, considerando o tipo de ave migratória circulante, a área ou sítio migratório, e a concentração humana com criação de aves domésticas.

A metodologia de coleta das amostras biológicas foi baseada na individualização de material biológico das aves que permitiu identificar com exatidão, quais espécies de aves se apresentam mais propícias a infecção viral. A partir de suas características de vida no meio ambiente, será possível avaliar o papel na disseminação do vírus entre as demais aves que estabeleçam contato direto e/ou indireto.

A coleta das amostras foi feita através de esfregaço de *swab* de traquéia e cloaca. Os *swabs* foram imediatamente colocados em tubos contendo meio de transporte viral (Hanks equilibrada, contendo 0,5% de lactalbumina, 10% de glicerol,



200 U / mL de penicilina, 20 µg / ml de estreptomicina, 100U/mL de sulfato de polimixina B, 250 µg / mL de gentamicina, e 50 U / mL de nistatina), e acondicionadas em caixas isotérmicas com (nitrogênio líquido) até o seu recebimento no laboratório de vírus respiratórios do IEC, onde foram mantidas a -70°C até seu processamento.

#### 5.6- EXTRAÇÃO DE DNA / RNA

A extração do RNA viral foi realizada a partir de 200 µL da amostra original (espécime coletado) utilizando-se o Kit comercial *PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit* (*Invitrogen Life Technologies*), seguindo orientações do fabricante. O RNA foi eluído com 50 µL de tampão de eluição foi estocado a -70°C.

#### 5.7- REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DA CITOCROMOOXIDASE.

Para estabelecer um controle de qualidade das técnicas aplicadas nesta pesquisa como: coleta de material biológico, isolamento de material genético (DNA/RNA) e reações de biologia molecular, foi estabelecido como controle de reação, um gene chamado de Citocromooxidase tipo 3, responsável pela via de fosforilação oxidativa no interior da mitocôndria. Em certas ordens taxonômicas, tais como mamíferos ou aves, o gene apresenta muitas zonas conservadas entre as sequências de diferentes espécies (quadro 4).

A técnica de PCR realizada foi feita utilizando-se o kit comercial *Platinum Taq®* - (*Invitrogen Life Technologies*), com H<sub>2</sub>O 10,5 µL, tampão 10x 2,5 µL, dNTP 2,5µL (5 µM), iniciadores senso e anti-senso 0,3µL (40µM) (Quadro 4), MgCl<sub>2</sub> 2,0 µL (50µM), TaqDNA polimerase 0,25 µL (5U/µL) e 5 µL de DNA (Volume total 25 µL). As condições de amplificação foram realizadas em termociclador Eppendorf (*Applied Biosciences*) com as seguintes etapas: Etapa 1- 94°C por 3 minutos, etapa 2- 35 ciclos de 94°C por 1 minutos, 54°C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto, etapa 3- 72°C por 5 minutos e etapa 4- 4°C por tempo indeterminado (∞). Cada conjunto de amostras submetido à amplificação inclui um controle negativo, que contém todos os reagentes da mistura e água livre de DNase e RNase, e um controle positivo de uma amostra conhecida previamente.

Iniciadores	Sequência (5'>3')	Fragmento
Senso	+6058-CCTATTCTGATTCTTCGGACA-6069	286 pb
Antisenso	-6326-GTGTAGTGTGGCGAGTCA-6344	

**Quadro 3- Sequência de iniciadores utilizados na PCR para controle interno.**

Ao término da amplificação, os amplicons foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 2%, corado por Gel Red *Nucleic acid stain* (Biotium), em tampão 1X tris-acetato-EDTA (TAE), inicialmente por 5 minutos a 80 volts (V), seguido de 25 minutos a 110V. O marcador de peso molecular de 50 *lines SmartLadder* (Eurogentec) foi aplicado em cada gel. A visualização dos amplicons foi realizada em transiluminador com luz ultravioleta (UV) e fotografado com auxílio do sistema de captura de imagem E-capt (Vilber Loumart).

#### 5.8- DETECÇÃO DO GENOMA VIRAL POR REAÇÃO EM CADEIA MEDIADA PELA POLIMERASE PRECEDIDA DE TRANSCRIÇÃO REVERSA EM TEMPO REAL (RT-qPCR).

Para detecção do vírus *Influenza A* utilizou-se kit comercial *SuperScript™ III One-step RT-PCR with Platinum Taq®* - (Invitrogen Life Technologies), seguindo orientações do fabricante com iniciadores e sonda específicos para o gene da matriz viral (M). Em resumo, cada mistura de reação incluiu 7,8 µL master mix 2x, 0,3 µL (40 µM) de cada iniciador, 0,3 µL (10 µM) de sonda, 0,3 µL (50 µM) de rox, 0,3 µL (5U) de enzima e 6 µL de RNA (volume total 15 µL). As condições de amplificação foram aplicados no sistema de detecção ABI PRISM 7500 (Applied Biosciences) com as seguintes etapas: Etapa 1- 50°C por 30 minutos, etapa 2- 95°C por 2 minutos, etapa 3- 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 55°C por 30 segundos (CDC 2009). Os reagentes e equipamentos utilizados nos testes são os mesmos utilizados pelos desenvolvedores da técnica no Centro de Controle e Prevenção de Doenças com as mesmas sequencia de iniciadores e sondas descritos no quadro 5 (CDC 2009).

Iniciadores e Sonda	Sequência (5'>3')	Fragmento
<i>Senso</i>	+156-GACCRATCCTGTCACCTCTGAC-177	94 pb
<i>Antisenso</i>	-226-AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA-250	
Sonda*	+201-TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG-224	

**Quadro 4 - Sequência de iniciadores e sonda utilizados na RT-qPCR.**

\*Sondas TaqMan® apresentando duas porções fluorescentes, uma localizada na extremidade 5' chamada de apresentador (Reporter, R) com uma molécula de 6-carboxifluoresceína (FAM) e outra na extremidade 3' chamada de capturador de energia (Quencher, Q), *Blackhole Quencher 1* (BHQ1) (*Biosearch Technologies, Inc. Novato, CA*).

### 5.9- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa BioEstat 5.0 (AYRES et al., 2007). A prevalência foi definida como o número de aves infectadas expresso como uma porcentagem do número total de indivíduos amostrados. O teste *Odds Ratio* foi aplicado para avaliar a significância estatística da positividade obtida entre as ordens ornitológicas, bem como entre as espécies com maior prevalência em relação as demais. Foi adotado nível de significância de 95% aos quais valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 6- RESULTADOS

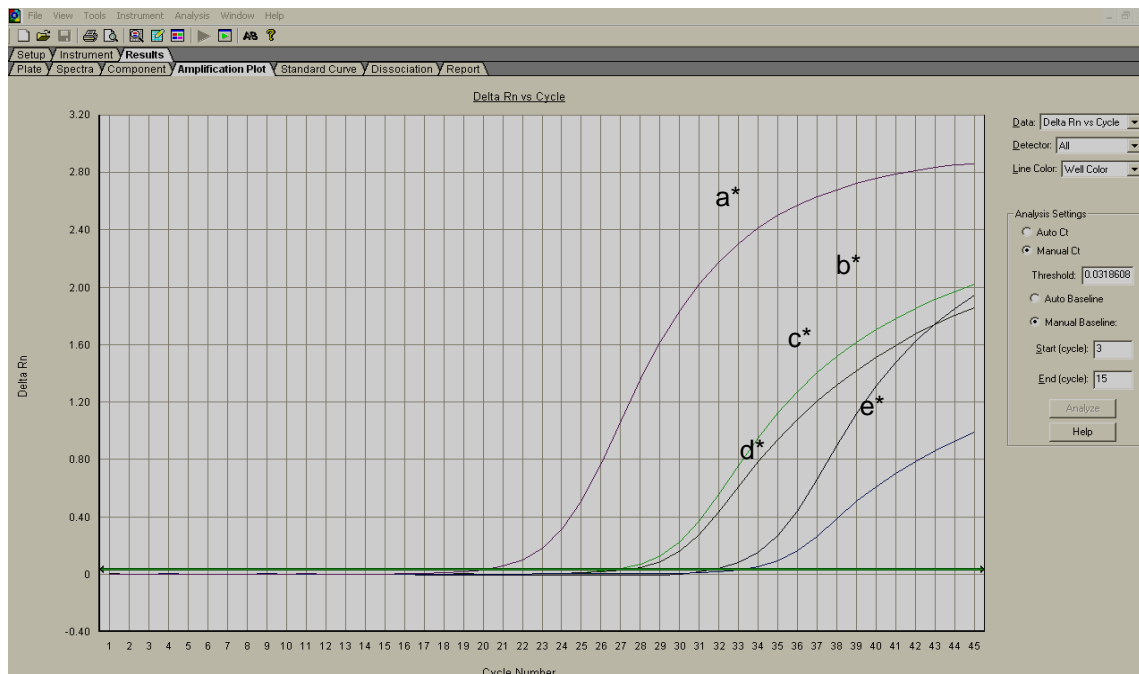
### 6.1- AMOSTRAS ANALISADAS

Foram analisadas 2.252 amostras de aves migratórias pertencentes a seis ordens e trinta e quatro espécies (tabela 1) para investigação de vírus *Influenza A*.

Desse total de amostras, 2.192 (97,3%) foram positivas para o gene citocromooxidase, sendo, portanto consideradas adequadas pela coleta, extração e armazenamento do material biológico.

### 6.2- DETECÇÃO VIRAL ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RT-qPCR PARA *Influenza A*

Dentre o total de amostras analisadas para o gene codificador da proteína de matriz (M) dos vírus *Influenza A* por RT-qPCR, 7,2% (158/2192) se revelaram positivas. Um total de 16 amostras apresentou curva de amplificação superior a Ct 37 estabelecidas pelo CDC e por isso foram consideradas inconclusivas. (Figura 9).



**Figura 9: Curva de amplificação da rRT-PCR, positivos para *Influenza A* gene Matriz. a\* Controle positivo, b\*, c\*, d\* e e\* amostras positivas.**

### 6.3 - DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS POSITIVAS POR CLASSIFICAÇÃO ORNITOLÓGICA

A detecção de amostras positivas para o vírus Influenza A mostrou diferenças entre as espécies de aves analisadas: 3,58% (56/1561) de positividade para a ordem *Charadriiformes*, 26,3% (71/269) para a ordem *Anseriformes*, 5,3% (2/38) para os *Pelecaniformes* e 10,9% (29/264) entre os representantes da ordem *Suliformes*. Não foi encontrada positividade para vírus Influenza entre as amostras das ordens *Passeriformes* e *Columbiformes* (Tabela 2). Análises estatísticas relacionadas à positividade obtida entre as ordens estão descritas na tabela 3.

**Tabela 2: Amostras positivas para vírus *Influenza A* distribuídas de acordo com a ordem de classificação ornitológica.**

Ordem	Espécies	Amostras analisadas	Amostras positivas	%	Prevalência %
<i>Charadriiformes</i>	<i>Actitis macularius</i>	80	4	5	3,6
	<i>Anous minutus</i>	2	0	0	
	<i>Anous stolidus</i>	9	0	0	
	<i>Arenaria interpres</i>	14	0	0	
	<i>Calidris alba</i>	2	1	50	
	<i>Calidris canutus</i>	1	0	0	
	<i>Calidris minutilla</i>	31	4	12,9	
	<i>Calidris pusilla</i>	101	11	10,8	
	<i>Chadrius collaris</i>	26	1	3,8	
	<i>Charadrius semipalmatus</i>	12	0	0	
	<i>Charadrius wilsonia</i>	2	0	0	
	<i>Pluvialis squatarola</i>	8	0	0	
	<i>Rynchops níger</i>	1	0	0	
	<i>Stena eurygnatha</i>	16	0	0	
	<i>Sternula antillarum</i>	48	4	8,33	
	<i>Sterna dougallii</i>	589	10	1,69	
	<i>Sterna fuscata</i>	43	0	0	
	<i>Sterna hirundo</i>	566	21	3,71	
	<i>Sterna superciliaris</i>	9	0	0	
<i>Tringa melanoleuca</i>	1	0	0		
<i>Anseriformes</i>	<i>Añas bahamensis</i>	4	4	100	26,4
	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	38	0	0	
	<i>Dendrocygna viduata</i>	227	67	29,5	
<i>Passeriformes</i>	<i>Himantopus palliatus</i>	1	0	0	0
	<i>Elaenia spectabilis</i>	10	0	0	
	<i>Pitango sufhoratus</i>	1	0	0	
<i>Columbiformes</i>	<i>Vireo glacilirosttis</i>	24	0	0	0
	<i>Zenaida auriculata</i>	19	0	0	
	<i>Colombina passerina</i>	5	0	0	
<i>Pelecaniformes</i>	<i>Bubulcus íbis</i>	38	2	5,3	5,3
<i>Suliformes</i>	<i>Fragata magnificens</i>	2	0	0	11,0
	<i>Sula dactylatra</i>	224	27	12	
	<i>Sula leucogaster</i>	20	1	5	
	<i>Sula sula</i>	18	1	5,5	

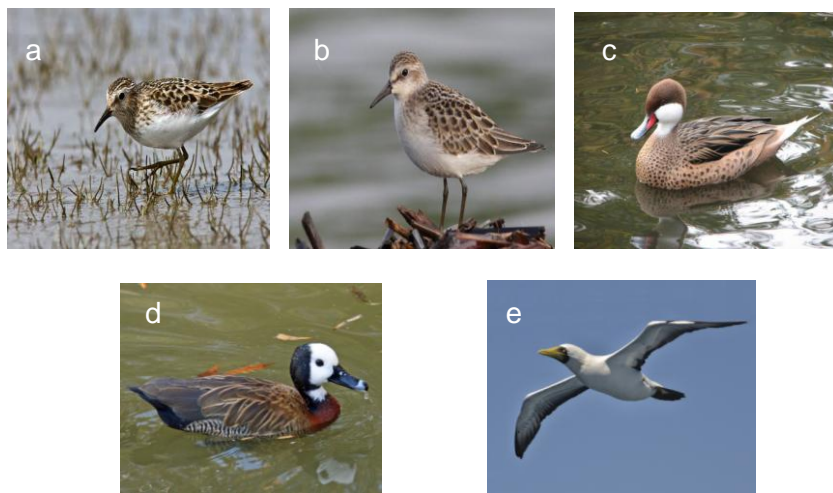
**Tabela 3: Avaliação da significância estatística da positividade obtida entre as ordens ornitológicas.**

Ordem	%	Odds Ratio	I.C 95 %	P-valor	NNH*
<i>Charadriiformes</i>	3,6	0,1930	0,1373 - 0,2713	< 0,0001	8
<i>Anseriformes</i>	26,4	8,5094	6,0015 - 12,0653	< 0,0001	5
<i>Pelicaniformes</i>	5,3	0,7115	0,1697 - 2,9828	0,8798	51
<i>Suliformes</i>	11,0	1,7210	1,1250 – 2,6327	0,0163	24

\* Números necessário para causar um evento (*Numbers Needed to Harm*)

#### 6.4 - AS ESPÉCIES DE AVES INFECTADAS PELO VIRUS INFLUENZA

Dentre as aves com maior número de amostras positivas estão cinco espécies pertencentes a três ordens (Figura 10): *Calidris minutilla* 12,9% (4/31) [Figura 10a], *Calidris pusilla* 10,8% (11/101) [Figura 10b], *Anas bahamensis* 100% (4/4) [Figura 10c], *Dendrocygna viduata* 29,5% (67/227) [Figura 10d], *Sula dactylatra* 12% (27/224) [Figura 10e]. Tais espécies, juntas, representam 71,51% (113/158) de todas as amostras positivas. Nas demais amostras positivas, um total de 30 estão distribuídas em oito espécies de aves, pertencentes, principalmente, a ordem *Charadriiformes*.



**Figura 10: Principais espécies de aves positivas para Influenza A. a: *Calidris minutilla*, Autor: Alan e Elaine Wilson. b: *Calidris pusilla*, Autor : Guy Poisson. c: *Anas bahamensis*, Autor : Michel Brochu. d: *Dendrocygna viduata*, Autor: Dick Daniels. e: *Sula dactylatra*, Autor: Miguel Andina.**

A relação estatística estabelecida entre as cinco espécies mais prevalentes com todas as demais testadas demonstrou alto grau de significância estatística (OR: 8,2644; IC 95% [5,7632 – 11,8511], Pvalor < 0,0001 e NNH: 7).

## 6.5- VARIAÇÃO GEOGRÁFICA

A distribuição geográfica das amostras positivas para *Influenza A* entre as regiões dos estados incluídos neste estudo mostrou que a Bahia apresentou taxa de positividade de 7,4% (104/1400), o Pará 4,4% (18/401) e Pernambuco de 9,2% (36/391) [tabela 4].

**Tabela 4: Distribuição geográfica das amostras positivas entre as regiões dos estados coletados.**

Estados	Municípios	N*	n**	%	P-valor
Bahia	Jandaíra	1160	102	7,4	0,6564
	Camaçari	206	0		
	Cacha Pregos	20	2		
	Nova Viçosa	14	0		
Pará	Salinópolis	401	18	4,4	0,0262
Pernambuco	F. Noronha	391	36	9,2	0,1145

**N\*:** total de amostras testadas por estado

**n\*\*:** total de amostras positivas para *Influenza A*

## 7- DISCUSSÃO

Este estudo foi elaborado para investigar a possível circulação do vírus de *Influenza* aviária em aves migratórias na costa brasileira, vindas, principalmente, do norte do continente Americano. Embora a gripe aviária seja considerada exótica na população humana e aves comerciais no Brasil (BRASIL 2009), este estudo mostrou que há uma significativa circulação viral nas aves migratórias que passam por diversas regiões do território brasileiro, conhecidas por apresentarem algum tipo de fluxo migratório.

O Departamento de Saúde Animal da Secretaria de Defesa Agropecuária e o órgão do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), são os responsáveis pela edição de políticas e fiscalização das atividades de prevenção à *Influenza* aviária em aves de uso comercial (BRASIL 2010a).

No entanto, informações disponíveis até o momento mostram que nenhum sistema de vigilância ativa e contínua é feita para coletar informações sobre esses vírus em aves migratórias no Brasil.

Nenhum país está totalmente livre do risco de ocorrência de *Influenza* aviária (GAUTHIER-CLERC et al., 2007). Mesmo que o Brasil esteja localizado numa posição geográfica distante dos principais focos da doença, há necessidade de se avaliar algumas vias de acesso da entrada do vírus no país. Nesse sentido é cabível todo e qualquer estudo que se proponha analisar os efeitos da inserção do vírus *Influenza*, seja ciclo de migração de aves selvagens, ou pelo fluxo de pessoas em regiões que apresentam a enfermidade ou até mesmo a entrada de produtos ou equipamentos contaminados (BRASIL 2010b).

Mesmo que as atenções estejam voltadas para a possibilidade do surgimento de novas variantes virais do vírus *Influenza*, capazes de infectar humanos por meio de adaptação genética de vírus circulante em aves migratória no sudeste asiático, principalmente, nos países como Bangladesh, Cambodja, China, Coréia do Sul, Indonésia, Japão, Laos, Paquistão, Taiwan, Tailândia e Vietnã entre outros, não significa que novas variantes do vírus surgirão necessariamente nesses países (GAUTHIER-CLERC et al., 2007, WHO 2013).

Em 2009, no México, onde se desencadeou a primeira pandemia do século XXI, causada pelo vírus A H1N1, testemunhou-se um evento real mesmo quando os dados epidemiológicos mundiais evidenciavam cenário diferente, que



levava a crer que uma futura pandemia causada pelo vírus da gripe iniciaria no eixo Euro-asiático (HARRIS et al., 2010).

A metodologia de coleta das amostras biológicas baseada na individualização de material biológico das aves permitiu identificar quais espécies de aves se apresentam mais propícias à infecção, com potencial de disseminação do vírus para as demais aves que estabeleçam contato direto e indireto.

Estabelecendo uma análise comparativa entre os poucos estudos anteriormente realizados no Brasil com a intenção de investigar a presença do vírus *Influenza A* em aves selvagens e domésticas, pode-se observar uma diferença significativa em relação aos resultados de amostras positivas. Em 2009 um estudo de doutorado, realizado pelo programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo e Instituto Butantan, envolvendo aves migratórias e residentes no Brasil coletadas de regiões dos estados brasileiros: Pará, Maranhão, Pernambuco, São Paulo, Santa Catarina e Rondônia, apresentou uma taxa de 1,36% de amostras positivas para *Influenza A* (GOLONO, 2009). Os métodos de detecção se basearam em ensaios de PCR convencional e GeneScan.

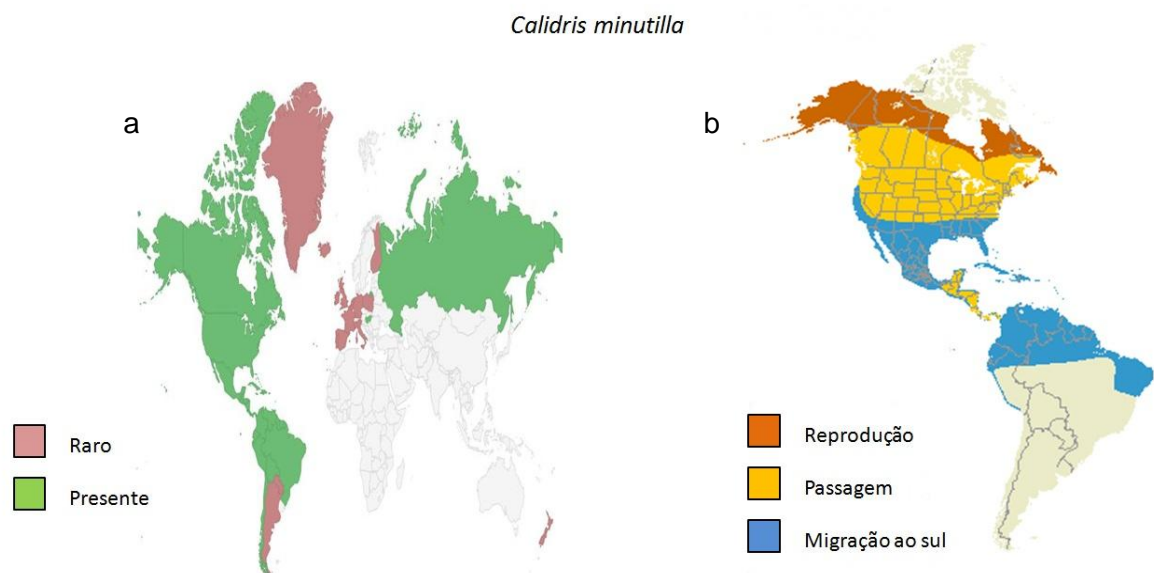
No ano de 2012, outro estudo, realizado no estado do Pará pelo Programa de Pós-graduação em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários da Universidade Federal do Pará, investigou a presença de gripe aviária em aves domesticadas nas comunidades do meio rural no estado do Pará. Entre as amostras analisadas nesse estudo, duas foram positivas para *Influenza A*, representando um percentual de 0,16% (REIS, 2012). O sistema de detecção se baseou em técnica de RT-qPCR

Evidentemente que diversas variáveis determinam a diferença entre os resultados obtidos, sendo, as classes de aves incluídas nos diferentes estudos, local de coleta, entre outros fatores. Entretanto, os dados obtidos até o momento possibilitam afirmar e referenciar a existência de *Influenza A* em aves migrantes e residentes no Brasil (GOLONO, 2009; REIS, 2012).

Entre os trabalhos realizados no país (GOLONO, 2009; REIS, 2012), incluindo este, uma grande variedade de espécies de aves circulantes no território nacional foi investigada. Tomando como indicadores as espécies deste estudo, foi possível estabelecer quais as espécies de aves que apresentaram maiores números de amostras positivas, sendo possível associar o vírus *Influenza A* às espécies mais

propensas a contrair e disseminar a infecção entre as demais aves. Obviamente há necessidade de estudos posteriores para verificar essa mesma associação entre as espécies ou exemplificar novos perfis de distribuição, o que caracterizará a possível ecologia do vírus *Influenza A* circulante em nosso meio.

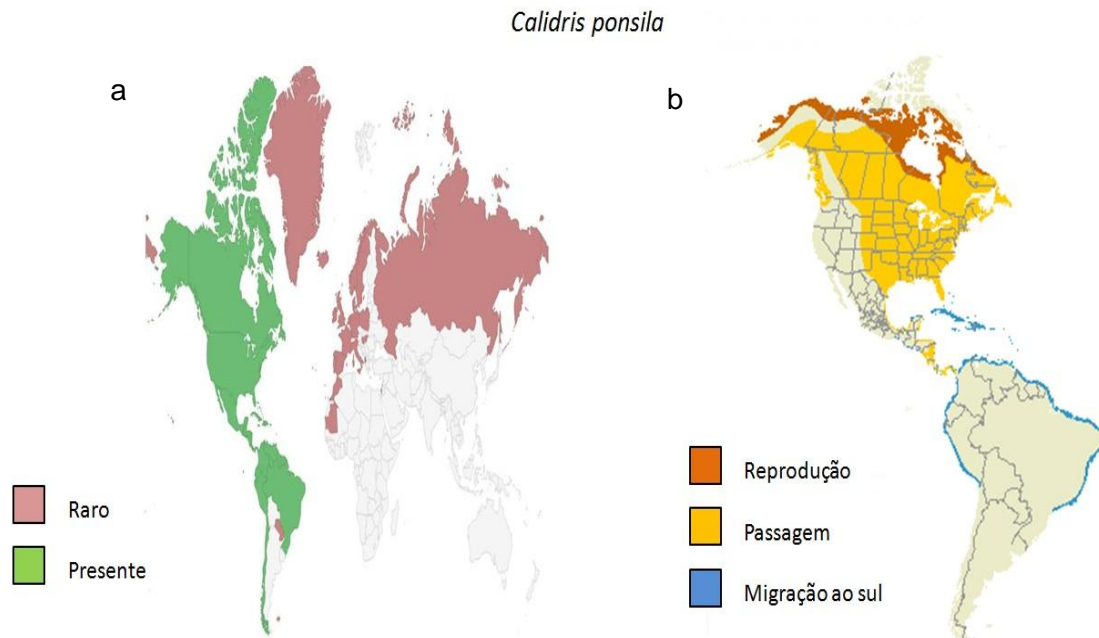
Dentre as espécies que mais apresentaram positividade, o *Calidris minutilla* é uma espécie ártica que em períodos de inverno sai da costa da Califórnia e Massachusetts para o sul da América do Sul, Europa e Ásia (Figura 11a) (AVIBASE, 2014). Visitantes abundantes no litoral setentrional do Brasil, aparecem transitoriamente em regiões serranas onde não nidificam, sendo comum também em margens de rios de água doce e praias de água salgada. São vistas em Pernambuco de setembro a março, meridionalmente até a Bahia e, excepcionalmente, no Rio Grande do Sul. Assinalado também, mas pontualmente, para Minas Gerais e Rio de Janeiro (Figura 11b) (SICK 2001).



**Figura 11: Distribuição geográfica da espécie *Calidris minutilla*. a) entre os continentes e b) entre as Américas mostrando as fases de migração.**

O *Calidris pusilla* é uma espécie procedente do Ártico, apresentando uma pequena população no leste da Sibéria (figura 11a). Após a época de reprodução, movem-se milhares de quilômetros ao sul onde podem ser encontradas em período de invernada na costa do Pacífico da América Central, ao longo das pequenas Antilhas e ao redor da metade norte da América do Sul, desde o Peru até o Uruguai (Figura 11b). Os maiores números de aves de invernada são encontrados na costa norte da América do Sul, especialmente Suriname e Guiana Francesa (AVIBASE,

2014). São encontrados no Brasil em diversos estados como: Pará, Maranhão, Ceará, Pernambuco e Rio Grande do Sul. Sua chegada no território brasileiro se dá nos meses de setembro/outubro.



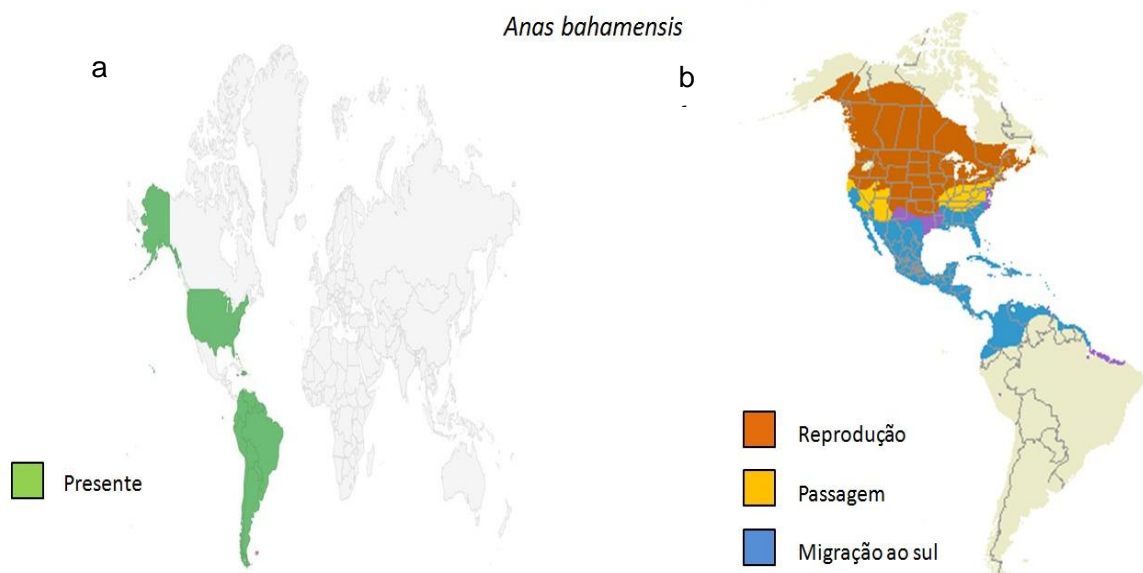
**Figura 12: Distribuição geográfica da espécie *Calidris ponsilla*. a) distribuição entre os continentes e b) distribuição entre as Américas mostrando as fases de migração.**

Ambas as espécies *Calidris minutilla* e *Calidris pusilla* são da ordem *Charadriiformes* e apresentam características morfológicas e migratórias semelhantes nas Américas. Entretanto, observa-se no território Brasileiro uma diferença na cobertura das áreas visitadas durante a migração por essas espécies. Vários pontos territoriais são possíveis de serem observados entre elas, principalmente nas regiões norte e nordeste. Juntas, as espécies representaram aproximadamente 8,8% de todas as amostras positivas para *Influenza A* deste estudo. A existência de amostras positivas nos confirma que essas aves apresentam-se como hospedeiro viável para infecção e transmissão para outras espécies mais suscetíveis a contaminação, contribuindo assim para a propagação do vírus, sendo por isso importante na diversidade dos estudos com aves.

Mesmo que as aves da ordem *Charadiiformes* sejam conhecidas como umas das principais classes de aves a albergar o vírus *Influenza A* (BAHL 2013), neste estudo apresentou uma prevalência inferior em relação às demais classes de aves que apresentaram amostras positivas. Entretanto, o alto valor de significância

observado permite inferir a cada dois anos uma a cada oito aves desta ordem pode estar infectada.

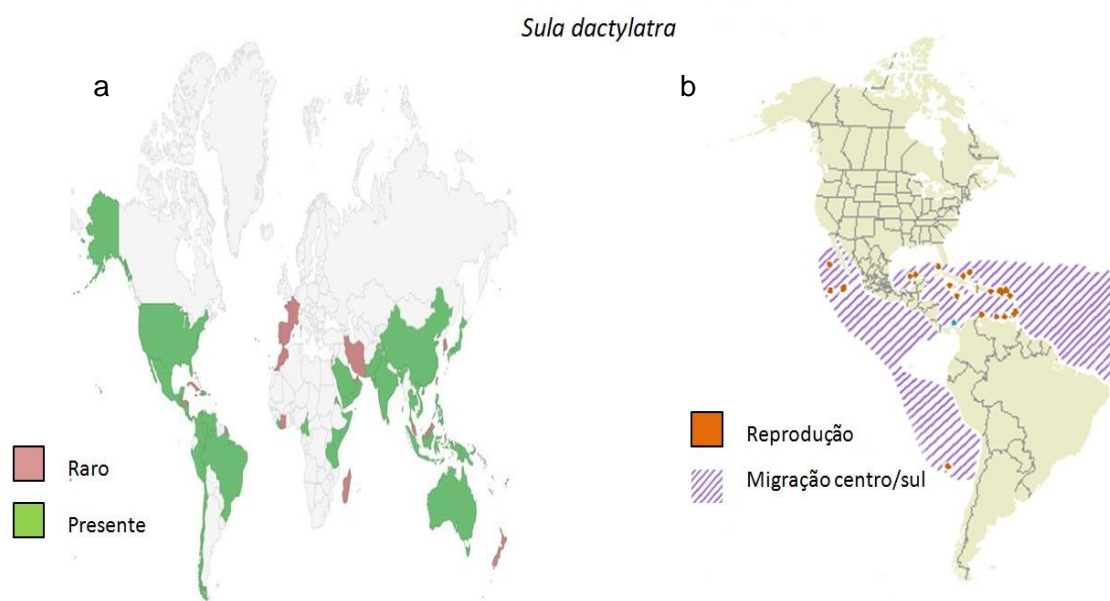
As aves da espécie *Anas bahamensis* se agrupam em pequenos grupos; habitam lagoas rasas e zonas úmidas em grande parte da América do Norte. Em período de invernada, no outono, iniciam seu fluxo migratório, deixando suas terras no Canadá e Estados Unidos bem antes de outras espécies em direção a América do Sul (Brasil, Chile, Argentina), quando inicia a primavera. Permanecem ai até o outono (Figura 13a) (AVIBASE, 2014). No Brasil, podem ser vistas no leste setentrional e oriental, inclusive no Rio de Janeiro, e excepcionalmente no Rio Grande do Sul (Figura 13b) (SICK, 2001).



**Figura 13: Distribuição geográfica da espécie *Anas Bahamensis*. a) distribuição entre os continentes e b) distribuição entre as Américas mostrando as fases de migração.**

Mesmo com um número pequeno de amostras da espécie *Anas bahamensis* (quatro), todas as amostras foram positivas para *Influenza A* pertencentes ao estado da Bahia no município de Camaçari, indicando que esta espécie, provavelmente, apresenta uma taxa de positividade elevada. O número reduzido de amostras se deu pelo baixo índice de captura desta espécie, logo para determinar de fato se essa ave apresenta, realmente, elevada suscetibilidade ao vírus *Influenza* necessariamente um número maior de amostras deveria ser coletado.

*Sula dactylatra* é apenas um visitante para a América do Norte. É encontrada em algumas regiões da Flórida, mas é mais frequentemente vista no mar no Golfo do México ou fora dos estados do Atlântico Sul (Figura 14a) (AVEBASE 2014). No Brasil, é encontrada, principalmente, no mês de setembro nas ilhas de Atol das Rocas e Fernando de Noronha, aparecendo periodicamente na Ilha da Trindade com visita regular, mas não frequente em pontos da costa de Cabo Frio, banco de São Tomé e Macaé no Rio de Janeiro e Salvador, Bahia e Santa Catarina, possuindo ainda vasta distribuição no hemisfério meridional (Figura 14b) (SICK 2001).

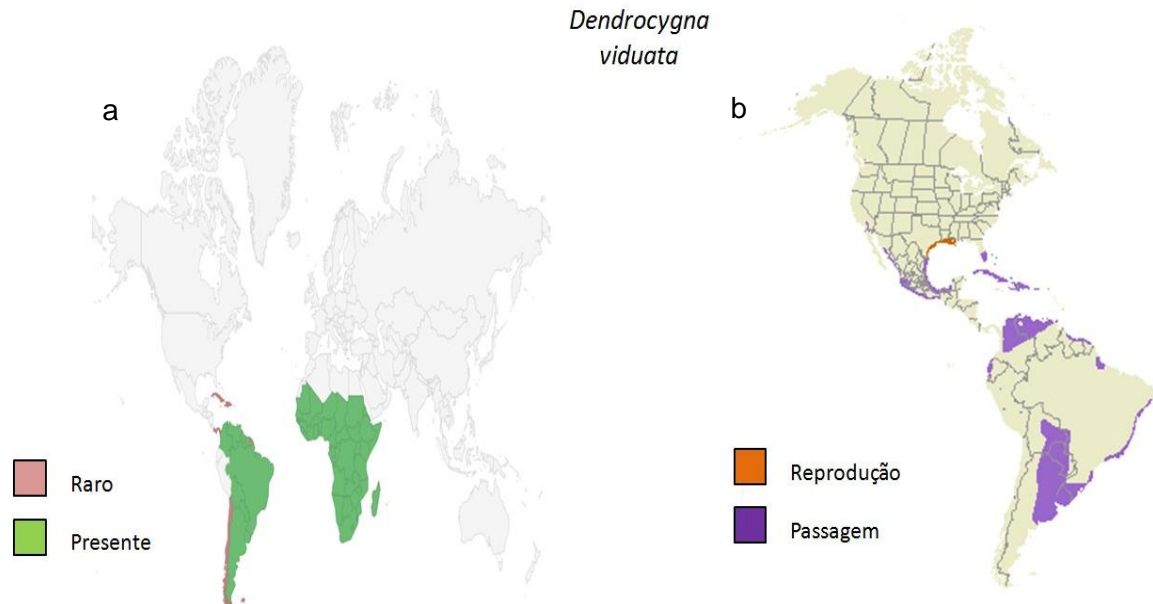


**Figura 14: Distribuição geográfica da espécie *Sula dactylatra*. a) distribuição entre os continentes e b) distribuição entre as Américas mostrando as fases de migração.**

As espécies *Anas bahamensis* da ordem *Anseriformes* e *Sula dactylatra* da ordem *Suliformes* representaram aproximadamente 19% de todas as amostras positivas, sendo que a maior número amostral está entre a *Sula dactylatra*. Por apresentarem hábitos aquáticos, sejam eles lugares úmidos, pequenos lagos e ilhas em alto mar, a disseminação do vírus por essas aves infectadas torna-se mais eficiente nesses ambientes, através da eliminação de excretas (SICK, 2001).

A espécie *Dendrocygna viduata*, durante o dia, descansa em bandos compactos, em campos inundáveis onde também se alimenta; pousa igualmente nas praias, à beira-mar e até mesmo sobre o mar quando atravessa uma enseada maior. Habita a região tropical da América do Sul até a Bolívia, Argentina, Uruguai e todo o Brasil e ainda está presente em boa parte do continente Africano de onde,

provavelmente, colonizou a América do Sul, (Figura 15a). Localmente é abundante, inclusive no sudeste do país, principalmente, no estado do Rio Grande do Sul, Ceará e Paraíba (Figura 15b) (SICK, 2001).



**Figura 15: Distribuição geográfica da espécie *Dendrocygna viduata*. a) distribuição entre os continentes e b) distribuição entre as Américas mostrando as fases de migração.**

A grande prevalência de casos positivos para *Influenza A* concentrara-se, principalmente, entre as amostras da espécie *Dendrocygna viduata*. Esses resultados fazem dessa espécie um alvo potencial de monitorização. Suas características de hábitos aquáticos se mostram mais evidentes que às demais aves presentes neste estudo (SICK, 2001).

Como esperado, as aves que mais apresentaram amostras positivas para o vírus *Influenza A* foram aquelas com hábitos aquáticos, que representavam, aproximadamente, 65% de todas as amostras positivas. Merece destaque as espécies da ordem *Anseriformes* que quando infectadas pelo vírus *Influenza A*, são conhecidas por não apresentarem sinais característicos da doença, e por consequência, nos períodos de migração, transportam o vírus a grandes distâncias, expondo outros animais, incluindo o homem (VAN RIEL et al., 2009).

Quase todas as ordens aviárias infectadas apresentaram valores altamente significativos para infecção pelo vírus *Influenza*, com exceção dos *Pelicaniformes*.

As ordens *Charadriiformes* e *Anseriformes* tiveram os maiores valores de NNH, havendo a possibilidade de uma a cada oito aves e uma em cinco,

respectivamente, serem infectadas em um período de dois anos. Estes resultados mostram que de fato as espécies pertencentes a estas ordens aviárias representam uma probabilidade maior de infecção e disseminação do vírus *Influenza A* entre as demais espécies.

Juntas, as cinco espécies de aves em destaque apresentam um valor extremamente significativo, mostrando que a chance de infecção destas aves pelo vírus *Influenza* chega a ser oito vezes maior que as demais espécies, revelando ainda que uma a cada sete aves dessas espécies podem ser infectada pelo vírus *Influenza A*, de acordo com o período de coleta deste estudo.

Mesmo não apresentando a mesma frequência que as aves destacadas, outras 11 espécies de aves também apresentaram amostras positivas para vírus *Influenza*. Tal achado demonstra que no Brasil existe uma grande variedade de espécies de aves migratórias que são portadoras do vírus *Influenza A* e que podem, em algum momento, ser um agente potencial de disseminação entre outras espécies animais.

A coleta das amostras ocorreu de forma esporádica, ou seja, foi realizada somente para verificar a possível circulação do vírus *Influenza A* em três estados brasileiros. Assim, uma investigação mais regular e a longo prazo é necessária para confirmar ou não os resultados aqui apresentados e definir os padrões sazonais e inter anuais da prevalência do vírus no Brasil.

Isso se faz ainda mais necessário, pois diversas regiões do Brasil não fizeram parte da pesquisa, apesar de apresentarem forte fluxo de aves migratórias. Tal vigilância seria de fundamental importância para a compreensão da dinâmica de transmissão e ecologia do vírus da *Influenza Aviária* em nossa região.

A prevalência entre as áreas investigadas apresentou diferença entre a distribuição de amostras positivas. A taxa mais baixa foi encontrada no estado do Pará representado pela região de Salinópolis. A baixa prevalência do vírus nas aves desta região talvez possa ser explicada pela ausência de representantes da classe *Anseriformes*.

O estado da Bahia apresentou a segunda maior taxa de prevalência de amostra positiva, e pode ser o estado com os dados mais próximos dos reais por ter o maior número de amostras coletadas por região. Entretanto, assim como no Pará, os maiores números de amostras pertencem principalmente à ordem

*Charadiiformes*. Mas mais uma vez, sabe-se que há grande circulação de aves da ordem *Anseriformes* na região

Já o estado de Pernambuco foi o que apresentou a maior prevalência de amostras positivas. Foi o estado com maior diversidade de espécies aviárias, tendo como principal representante na amostra as aves da ordem *Anseriforme*, o que pode *per se*, explicar a maior taxa de amostras positivas.

Juntas essas regiões se mostraram como bom alvo para o desenvolvimento de novos estudos de vigilância, ficando como sugestão a melhor distribuição do número de amostras entre as espécies de aves para um conhecimento mais próximo da realidade.

Estes achados justificam novas investigações para compreender a dinâmica do vírus *Influenza* na população de aves selvagens, para melhor avaliação da importância da circulação local do vírus como uma fonte, em potencial, de infecção para outros animais, inclusive o homem.



## 8- CONCLUSÕES

- ✓ Este estudo proporcionou uma análise local de distribuição do vírus *Influenza A* em regiões do norte e nordeste Brasileiro;
- ✓ As espécies de aves da ordem *Anseriformes* foram as que apresentaram maior positividade para vírus *Influenza A*;
- ✓ O teste aplicado como controle interno tendo como alvo o gene citocromooxidase mostrou-se bastante eficiente, estabelecendo um padrão de confiabilidade das técnicas aplicadas ao longo do desenvolvimento da pesquisa, além de estabelecer o critério de inclusão e exclusão das amostras viáveis para o estudo.
- ✓ Os dados de classificação das aves deste estudo, aliados as informações virológicas ampliam a compreensão da ecologia de gripe aviária em aves selvagens em nossa região.
- ✓ As aves aquáticas se mostraram mais propícias às infecções, sugerindo possíveis alvos da vigilância epidemiológica.
- ✓ Supervisão contínua no âmbito desta estratégia ao longo de vários anos permitirá uma melhor compreensão do papel das aves selvagens na transmissão intercontinental do vírus da *Influenza Aviária*.

## 9- REFERÊNCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALEXANDER, D. J. A review of avian *Influenza* in different bird species, **Veterinary Microbiology**; 74(1-2), 3-13, 2000.

ALEXANDER, D. J. An overview of the epidemiology of avian *Influenza*. **Vaccine** 25(30), 5637-44, 2008.

ALEXANDER, D. J. Avian *Influenza* diagnosis, **Zoonoses Public Health** 55(1), 16-23, 2009.

ANDRADE, C. R. D, IBIAPINA, C. D. C, CHAMPS N.S, JUNIOR A.C.C.D, PICININ I.F.D. Gripe aviária: a ameaça do século XXI. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**; 35(4):470-9, 2009.

AVIBASE, The World Bird Database <http://avibase.bsc-eoc.org/avibase.jsp?pg=home&lang=EN>, Acessado em 03/01/2014.

AYRES, M., JR, M.A., AYRES, D.L., dos SANTOS, A.S. BioEstat 5.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 5ed. Belém, Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá – IDSM/MCT/CNPq. 2007. 364pp.

BAHL, J., KRAUSS, S., HERTZ, D. K., FOURMENT, M., RAVEN, G., PRYOR, S. P., NILES, L. J., DANNER, A., WALKER, D., MENDENHALL, I. H., SU, Y. C. F., DUGAN, V. G., HALPIN, R. A., STOCKWELL, T. B., WEBBY, R. J., WENTWORTH, D. E., DRUMMOND, A. J., SMITH, G. J. D., WEBSTER, R. G., Influenza A Virus Migration and Persistence in North American Wild Birds. **PLOS Pathogens** 9(8): e1003570. doi:10.1371/journal.ppat.1003570, 2013.

BASLER, C. F.; AGUILAR, P. V. Progress in identifying virulence determinants of the 1918 H1N1 and the Southeast Asian H5N1 influenza A viruses. **Elsevier: Antiviral Research**, v. 79, p. 166-178, 2008.

BOUVIER, N. M; PALESE, P., The biology of Influenza viruses. **Vaccine**, p. D49–D53, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vademecum: sem banalizar nem superestimar, *Influenza*: aprender e cuidar, Brasília: MS, p. 1-22, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Protocolo para o enfrentamento à pandemia de *Influenza* Pandêmica (H1N1) 2009: **Ações da atenção primária à saúde**, Brasília: MS, 2010a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**. Brasília: MS, P. 1-21, 2010b.

BROWN, J. D., STALLKNECHT, D. E., and SWAYNE, D. E. Experimental Infection of Swans and Geese with Highly Pathogenic Avian *Influenza* Virus (H5N1) of Asian Lineage. **Emerging Infectious Disease Journal** Vol. 14, n.1 42(707), p. 220-25, 2008.

CALISHER, C. H. Swine Flu. **Croatian Medical Journal**; 50(4): p. 196-209, 2009.

CAPUA, I., MUTINELLI, F., MARANGON, S., ALEXANDER, D. J., H7N1 avian influenza in Italy (1999- 2000) in intensively reared chicken and turkeys. **Avian pathology**; 29: p. 537-43, 2000.

CAPUA I., MUTINELLI F., Low pathogenicity (LPAI) and highly pathogenic (HPAI) avian influenza in turkeys and chicken. In: Capua I, Mutinelli F. (eds.), A Colour Atlas and Text on Avian Infuenza, **Papi Editore**, pp. 13-20, 2001.

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). Updated Interim Recommendations for the Use of Antiviral Medications in the Treatment and Prevention of Influenza for the 2009-2010 Season, 2009. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/h1n1flu/recommendations.htm>>. Acesso em: 09/02/2012.

COUCEIRO, J. N. S. S., ALBUQUERQUE, M. C. M. Viroses Respiratórias. In: SANTOS, N. S. O., ROMANOS, M. T. V., WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. 2.ed. Rio de Janeiro. Guanabara-Koogan. cap.9, p. 245-264, 2008.

COX, N. J., SUBBARAO, K. Global epidemiology of Influenza: past and present. *Annu. Revist. Medical*, 51: p. 407-421, 2000.

DAVID M. MORENS, M.D., JEFFERY K. TAUBENBERGER, M.D., and ANTHONY S. FAUCI, M.D. The Persistent Legacy of the 1918 Influenza Virus. **The new england journal of medicine** n.09, p.406-412, 2009.

DE MARCO, M. A., FONI, G. E., CAMPITELLI, L., RAFFINI, E., DI TRANI, L., DELOGU, M., GUBERTI, V., BARIGAZZI, G., and DONATELLI, I. Circulation of Influenza viruses in wild waterfowl wintering in Italy during the 1993-99 period: evidence of virus shedding and seroconversion in wild ducks. **Avian Diseases** 47(3 Suppl), p. 861-866, 2003.

ELBERS, A. R., KOCH, G., BOUMA, A. Performance of clinical signs in poultry for the detection of outbreaks during the avian influenza A (H7N7) epidemic in The Netherlands in 2003. **Avian Pathology**; 34: p. 181-187, 2005.

FOUCHIER, R. A., SCHNEEBERGER, P. M., ROZENDAAL, F. W., BROEKMAN, J. M., KEMINK, S. A., MUNSTER, V., KUIKEN, T., RIMMELZWAAN, G. F., SCHUTTEN, M., VAN DOORNUM, G. J., KOCH, G., BOSMAN, A., KOOPMANS, M., AND OSTERHAUS, A. D. Avian Influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A** 101(5), p. 1356-13561, 2004.

FOUCHIER, R. A.; MUNSTER, V.; WALLENSTEN, A.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; SMITH, D.; RIMMELZWAAN, G. F.; OLSEN, B.; OSTERHAUS, A. D. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2814-822, 2005.

GAUTHIER-CLERC, M., LEBARBENCHON C. & THOMAS. F. Recent expansion of highly pathogenic avian Influenza H5N1. **Critical Review**, 10.1111/j.1474-919x.2007.00699, 2007.

GILBERT, M., CHAITAWEESUB, P., PARAKAMAWONGSA, T., PREMASHHIRA, S., TIENSIN, T., KALPRAVIDH, W., WAGNER, H. & SLINGENBERGH, J. Free-grazing ducks and highly pathogenic avian Influenza, Thailand. **Emerging Infectious Disease journal**. 12: p. 227–234, 2006.

GOLONO, M. A, Epidemiologia e caracterização molecular de vírus Influenza em aves residentes e migratórias no Brasil. Tese de doutorado, 2009.

HARRIS, M. T., BROWN, J. D., GOEKJIAN, V. H., LUTTRELI, M. P., POULSON, R. L., WILCOX, B. R., SWAYNE, D. E., and STALLKNECHT, D. E., Canada Geese and the Epidemiology of Avian Influenza Viruses, 2010. **Journal of Wildlife Diseases**, 46(3), pp. 981–987, 2010.

HAYDEN, F., AND CROISIER, A. Transmission of avian Influenza viruses to and between humans. **Journal of Infectious Diseases** 192(8), p. 1311-1314, 2005.

KAISER, J. A., A one size fits all flu vaccine. **Science**, 312: p. 380-382, 2006.

KATZ, J. M., VEGUILLA, V., BELSER, J. A., MAINES, T. R., VAN HOEVEN, N., PAPPAS, C., HANCOCK, K., AND TUMPEY, T. M. The public health impact of avian *Influenza* viruses. **Poultry Science** 88(4), p. 872-879, 2009.

KAYE, D., PRINGLE, C. R., Avian Influenza viruses and their implication for human health. **Clinical Infectious Diseases**; 40: p. 108-112, 2005.

KIM J., NEGOVETICH, N., FORREST, H, WEBSTER. R. The "Trojan Horses" of H5N1 Influenza. **Influenza Other Respi Viruses**; 3(4): p. 121-128, 2009.

KLEMPNER, M. S., SHAPIRO, D. S., Crossing the species barrier - one small step to man, one giant leap to mankind. **N Engl J Med**; 350: p. 1171-1172, 2004.

KLENK H. D., MATROSOVICH M. N., STECH. Avian Influenza. **Monographs Virology**. Basel, Karger, vol. 27, pp 101-117, 2008.

KOOPMANS, M., WILBRINK, B., CONYN, M., NATROP, G., VAN DER NAT, H., VENNEMA, H., MEIJER, A., VAN STEENBERGEN, J., FOUCHIER, R., OSTERHAUS, A., AND BOSMAN, A. Transmission of H7N7 avian Influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. **Lancet** 363(9409), p. 587-593, 2004.

KORTEWEG, C., AND GU, J. Pathology, molecular biology, and pathogenesis of avian Influenza A (H5N1) infection in humans. **American Journal of Clinical Pathology** 172(5), p. 1155-1170, 2008.

LAVIER, G., GARMAN, E., Pandemic Influenza: its origin and control. **Microbes Infections**, 4(13) : p. 1309-1316 2002.

LEE, C.W, SWAYNE, D.E, LINARES, J.A, SENNE, D.A, SUAREZ, D.L. H5N2 avian Influenza outbreak in Texas in 2004: the first highly pathogenic strain in the United States in 20 years? **Journal of Virology**, 79: p. 11412-11421, 2005.

LEWIS, D. B. Avian Flu to Human Influenza. **Annual Review of Medicine**, v. 57, p. 139-154, 2006.

MATROSOVICH, M. N., MATROSOVICH, T. Y., GRAY, T., ROBERTS, N. A., and KLENK, H. D. Human and avian Influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A** 101(13), 4620-4, 2004.

MORAES, H. L. S., SALLE, C. T. P., CARON, L. F. Influenza Aviária. In Berchieri & Maccari, **Doença das Aves**, 2<sup>a</sup>. ed. Campinas, FACTA, 2009.

National Center for Biotechnology Information (NCBI), Scheme of *Influenza A* virus replication. Modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome>, 2010.

NEUMANN, G. E KAWAOKA, Y. Host Range Restriction and Pathogenicity in the Context of Influenza Pandemic. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12. n. 6, p. 881-886, 2006.

NEUMANN, G., NODA. T.; KAWAOKA, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. **Nature**, n. 18, p. 931-939, 2009.

PALESE, P., BOUVIER, N. M. The biology of Influenza viruses. *Vaccine*, p. D49–D53, 2008.

PALESE, P.; SHAW, M. L. *Orthomyxoviridae: the Viruses and Their Replication*. In: KNIPE, D.M.; GRIFFIN, D.E., LAMB, R.A., STRAUS, S.E., HOWLEY, P.M., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B. **Fields Virology**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins Publishers. cap.47, p. 1647-1689, 2007.

PANTIN-JACKWOOD, M. J., and SWAYNE, D. E. Pathogenesis and pathobiology of avian *Influenza* virus infection in birds. **Revisit Science Technology** 28(1), 113-36, 2009.

PERDUE, M. L., AND SWAYNE, D. E. Public health risk from avian *Influenza* viruses. **Avian Disiases** 49(3), p. 317-327, 2005.

PERKINS, L. E., SWAYNE, D. E., Comparative susceptibility of selected avian and mammalian species to a Hong Kong-origin H5N1 high-pathogenicity avian *Influenza* virus. **Avian Disiases**. 47(3 Suppl): p. 956-967, 2003.

POTTER, C.W. A history of *Influenza*. **Journal of Applied Microbiology**. n. 91, p. 572-579, 2001.

ROGERS, G. N., and PAULSON, J. C. Receptor determinants of human and animal *Influenza* virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 Haemagglutinin based on species of origin. **Virology** 127(2), p. 361-373, 1983.

SHINYA, K., EBINA, M., YAMADA, S., ONO, M., KASAI, N., and KAWAOKA, Y. Avian flu: *Influenza* virus receptors in the human airway. **Nature** 440(7083), p. 435-436, 2006.

SICK, H. Composição da avifauna Brasileira. In J. F. Pacheco (Ed.) *Ornitologia Brasileira* (pp. 129-135). Rio de Janeiro, Brasil: **Nova Fronteira**, 2001.

SMITH, F. B.; The Russian Influenza in the United Kingdom, 1889-1894. **Social History of medicine**, (8): p. 55-73, 1995.

STALLKNECHT, D.E, BROWN, J.D. Ecology of avian Influenza in wild birds. In: Swayne, D, ed. *Avian Influenza*. **Avian Disiases** p. 43–58, 2008.

STEINHAUER, D. A. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of Influenza virus. **Virology** 258(1), 1-20, 1999.

STIENEKE-GROBER, A., VEY, M., ANGLIKER, H., SHAW, E., THOMAS, G., ROBERTS, C., KLENK, H. D., and GARTEN, W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. **The EMBO Journal** 11(7), p. 2407-2414, 1992.

SUAREZ, D. L., SENNE, D. A., BANKS, J., BROWN, I. H., ESSEN, S. C., LEE, C. W., MANVELL, R. J., MATHIEU-BENSON, C., MORENO, V., PEDERSEN, J. C., PANIGRAHY, B., ROJAS, H., SPACKMAN, E., ALEXANDER, D.J. Recombination resulting in virulence shift in avian Influenza outbreak, Chile. **Emerging Infectious Diseases**; vol. 10: p. 693-699 ,2004.

SULLIVAN, S. J., JACOBSON, R. M., DOWDLE, W. R., POLAND, G. A. 2009 H1N1 Influenza. **Mayo Clinic Proceedings**. n. 1, p. 64-76, 2010.

SWAYNE, D.E., SUAREZ, D.L., Highly pathogenic avian Influenza. **Science Technology**; 19: p. 463-468, 2000a.

SWAYNE, D. E., HALVORSON, D. A., Y. M., FADLY, A. M., Glisson, J. R., MCDOUGALD, L. R., NOLAN, L. K. SWAYNE, D. E., "Influenza", **Diseases of Poultry** 12 ed., Iowa, U.S.A, 2008.

TAUBENBERGER, J.K., REID, A.H., LOURENS, R.M., WANG, R., JIN, G., FANNING, T.G., Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. **Nature**, 437: p. 889-893, 2005.

TAUBENBERGER, J. K., MORENS, D. M. Influenza: The Once and Future Pandemic. **The Science of Influenza**. n. 3, p.16-26, 2010.

TONG, S., Li Y., RIVAILLER, P., CONRARDY, C., CASTILLO, D. A. , CHEN, L. M., RECUENCO, S., ELLISON, J. A., DAVIS, C. T., YORK, I. A., TURMELLE, A. S., MORAN, D., ROGERS, S., SHI, M., TAO, Y., WEIL, M. R., TANG, K., ROWE, L. A., SAMMONS, S., XU, X., FRACE, M., LINDBLADE, K. A., COX, N. J., ANDERSON, L. J., RUPPRECHT, C. E., DONIS, R.O. A distinct lineage of *Influenza A* virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 13;109 (11): p. 4269-4274, 2012.

TRAN, T. H., NGUYEN, T. L., NGUYEN, T. D., LUONG, T. S., PHAM, P. M., NGUYEN, V. C., PHAM, T. S., VO, C. D., LE, T. Q., NGO, T. T., DAO, B. K., LE, P. P., NGUYEN, T. T., HOANG, T. L., CAO, V. T., LE, T. G., NGUYEN, D. T., LE, H. N., NGUYEN, K. T., LE, H. S., LE, V. T., CHRISTIANE, D., TRAN, T. T., MENNO DE, J., SCHULTSZ, C., CHENG, P., LIM, W., HORBY, P., AND FARRAR, J.. Avian Influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. **The New England Journal of Medicine** 350(12), p. 1179-1188, 2004.

TWEED, S. A., SKOWRONSKI, D. M., DAVID, S. T., LARDER, A., PETRIC, M., LEES, W., LI, Y., KATZ, J., KRAJDEN, M., TELLIER, R., HALPERT, C., HIRST, M., ASTELL, C., LAWRENCE, D., AND MAK, A. Human illness from avian Influenza H7N3, British Columbia. **Emerging Infectious Diseases**, 10(12), 2196-9, 2004.

UNGCHUSAK, K., AUEWARAKUL, P., DOWELL, S. F., KITPHATI, R., AUWANIT, W., PUTHAVATHANA, P., UIPRASERTKUL, M., BOONNAK, K., PITTAYAWONGANON, C., COX, N. J., ZAKI, S. R., THAWATSUPHA, P., CHITTAGANPITCH, M., KHONTONG, R., SIMMERMAN, J. M., AND CHUNSUTTHIWAT, S.. Probable person-to-person transmission of avian Influenza A (H5N1). **New England Journal of Medicine** 352(4), 333-40, 2005.

VAN GILS, J. A., MUNSTER, V. J., RADERSMA, R., LIEFHEBBER, D., FOUCHIER, R. A. M. & KLASSEN, M. Hampered Foraging and Migratory Performance in Swans Infected with Low-Pathogenic Avian Influenza A Virus. **Plos One** 2(1): e184. doi:10.1371/journal.pone.0000184, 2007.

VAN RIEL, D., VAN DEN BRAND, J. M., MUNSTER, V. J., BESTEBOER, T. M., FOUCHIER, R. A., OSTERHAUS, A. D., AND KUIKEN, T. Pathology and virus distribution in chickens naturally infected with highly pathogenic avian Influenza A virus (H7N7) During the 2003 outbreak in The Netherlands. **Veterinary Pathology** 46(5), 971-6, 2009.

WEBSTER, R. G., BEAN, W. J., GORMAN, O. T., CHAMBERS, T. M., and KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of Influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, vol. 56 (1), 152-79, 1992.

WEBSTER, R. G., SHARP, G. B., AND CLAAS, E. C. Interspecies transmission of Influenza viruses. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 152(4 Pt 2), S25-30, 1995.

WEBSTER, R. G. Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. **Arch Virol Suppl** 13, 105-13, 1997.

WEBSTER, R.G., Influenza: An emerging disease. **Emerging Infectious Diseases**, 4: 436-41, 1998.

WEBSTER, R. G., PEIRIS, M., CHEN, H., GUAN, Y. H5N1 outbreaks and enzootic Influenza. **Emerging Infectious Diseases journal**, vol. 12: 3-8, 2005.

WIDJAJA, L., KRAUSS, S. L., WEBBY, R. J., XIE, T., WEBSTER, R. G., Matrix gene of influenza A viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza A viruses. **Journal of Virology**, vol. 78: 8771-9, 2004.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Pandemic (H1N1) 2009 - update 97 [http://www.who.int/csr/don/2010\\_04\\_23a/en/](http://www.who.int/csr/don/2010_04_23a/en/) . **Weekly Epidemiological Bulletin**, n. 4, p. 21-28, 2010.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Cumulative number of confirmed human cases of avian Influenza A (H5N1), 2013 < [http://www.who.int/Influenza/human\\_animal\\_interface/H5N1\\_cumulative\\_table\\_archives/en/](http://www.who.int/Influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/)>. Acessado em 07 de abril de 2013.

WRIGHT, P. F.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D.M.; GRIFFIN, D.E., LAMB, R.A., STRAUS, S.E., HOWLEY, P.M., MARTIN, M.A., ROIZMAN, B. **Fields Virology**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins Publishers. cap.48, p. 1691-1738, 2007.

YAMADA, S., SUZUKI, Y., SUZUKI, T., LE, M. Q., NIDOM, C. A., SAKAI-TAGAWA, Y., MURAMOTO, Y., ITO, M., KISO, M., HORIMOTO, T., SHINYA, K., SAWADA, T., USUI, T., MURATA, T., LIN, Y., HAY, A., HAIRE, L. F., STEVENS, D. J., RUSSELL, R. J., GAMBLIN, S. J., SKEHEL, J. J., AND KAWAOKA, Y. Haemagglutinin mutations responsible for the binding of H5N1 Influenza A viruses to human-type receptors. **Nature** 444 (7117), 378-82, 2006.

YASUÉ, M., FEARE, C.J., BENNUN, L. & FIEDLER, W. The epidemiology of H5N1 Avian Influenza in wild birds: why we need better ecological data. **Bioscience Journal**, 56: 923-929, 2006.

ZAMBON, M. C. Epidemiology and pathogenesis of Influenza. **Journal Antimicrob Chemother**; 44 Suppl B, 3-9, 1999.

ZHANG, L., KATZ, J. M., GWINN, M., DOWLING, N. F., KHOURY, M. J. Systems-based candidate genes for human response to Influenza infection. **Infection, Genetics and Evolution**, n. 9, p.1148–1157, 2009.



## 10- ANEXO



Parecer de Aprovação Nº 013/2012/CEUA/IEC/SVS/MS  
Protocolo CEUA - nº 0011/2012

Ananindeua/PA, 27 de junho de 2012.

Projeto: “**Detecção de vírus influenza A em aves migratórias**”.

Pesquisador Responsável: Wyller Alencar de Mello

Conforme decisão da Comissão de Ética no uso de Animais-CEUA do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado**.

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,



Livia Medeiros Neves Casseb  
Coordenadora da CEUA/IEC