

DILMARA REISCHAK

Vírus da influenza aviária: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil

São Paulo

2016

DILMARA REISCHAK

Vírus da influenza aviária: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3348
FMVZ

Reischak, Dilmara
Vírus da influenza aviária: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil / Dilmara Reischak. -- 2016.
137 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain.

1. Influenza aviária. 2. Monitoramento. 3. Aves de subsistência. 4. Sítios de aves migratórias. 5. Brasil. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Vírus da influenza aviária: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil", protocolado sob o nº 2721/2013, utilizou 2.816 amostras de soro "e swabs", sob a responsabilidade do Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, foi realizado de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião do dia seis de fevereiro de 2013.

We certify that the Research "Avian influenza virus: monitoring in backyard poultry raised in the vicinity of concentration areas of migratory birds in Brazil", protocol number 2721/2013, used 2.816 serum samples "swabs", under the responsibility Prof. Dr. Leonardo José Richtzenhain, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved at the meeting on 6 February of 2013.

São Paulo, 27 de junho de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: REISCHAK, Dilmara

Título: **Vírus da influenza aviária**: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Às minhas filhas, Clara e Marina, que tiveram um pouco ainda menos de mim durante o período de realização desde trabalho.

Aos meus pais, que mesmo sem muitos recursos, não mediram esforços para que eu tivesse acesso à educação.

À sociedade brasileira, que financiou minha formação acadêmica do jardim de infância à pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Ninguém disse que seria fácil e não havia expectativa de que fosse. Conciliar as vidas acadêmica, profissional e doméstica durante quatro anos foi um malabarismo e tanto, mas chegou ao fim. E se este trabalho chegou ao final, foi porque muitas pessoas contribuíram para que isso acontecesse. Portanto, gostaria de deixar aqui registrados os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, que me concedeu inspiração, serenidade e fortaleza nos momentos de desolação.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo J. Richtzenhain, pelo privilégio de ser sua orientada e pelas valiosas contribuições.

Ao MAPA, pelo incentivo concedido na forma de afastamento parcial, sem o qual seria impossível a execução deste curso de Doutorado.

À Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários por ter concedido autorização para realização desta Pós-Graduação.

À Coordenação do Lanagro-SP, representada por André e Fátima, que sempre incentivou a realização deste trabalho e compreendeu meus momentos de ausência.

Aos meus colegas, FFAs Maria Ângela Orsi e Christian S. Domingues, que me substituíram nos períodos de afastamento e mantiveram as atividades da Unidade de Sanidade Aviária em movimento.

Aos colaboradores da Unidade de Sanidade Aviária que, mesmo sem saber, me auxiliaram durante a execução deste trabalho. Um agradecimento especial ao pessoal, antigo e atual, da Sorologia, da Biologia Molecular e da área administrativa. Um obrigada carinhoso à Soraya, que me ajudou na realização de alguns ensaios específicos.

A todos os colegas veterinários dos órgãos executores estaduais (ADAB, ADAGRO, ADEPARA, CDA, CIDASC, IAGRO e SEAPI) que realizaram as colheitas das amostras e a todos os proprietários de aves de subsistência.

Aos colegas responsáveis pelo PNSA, seja na CSA, nas SFAs ou nos órgãos executores estaduais, que cederam fotos e informações preciosas no decorrer deste período.

À Biochek Smart Veterinary Diagnostics, representada no Brasil pela ABASE Comércio e Representação Ltda., que cedeu os kits de ELISA necessários para a realização deste trabalho. Obrigada Mariângela Manfredini, pelas tratativas iniciais que resultaram nessa parceria!

Aos meus ex-orientadores, Valéria Moojen e José Maria Wiest, fundamentais na minha formação como veterinária e virologista.

Aos microbiologistas do NVSL/APHIS/USDA, Dennis A. Senne e Janice C. Pedersen, pelas oportunidades ímpares de convivência e aprimoramento profissional.

Aos meus queridos amigos da Gang da Virologia da FAVET/UFRGS (Aline, Andrea e Bira) que, mesmo distantes fisicamente, continuam contribuindo nos meus problemas virológicos.

Ao pessoal do VPS/FMVZ/USP e do LABMAS que conheci durante este período, especialmente à Patrícia e ao Danival, que tantas vezes me socorreram nos assuntos discentes.

Ao Serviço de Normalização Bibliográfica da Biblioteca da FMVZ/USP, representado pela Elza, que auxiliou na revisão deste documento.

À CEUA da FMVZ/USP pela presteza em ajudar.

Aos meus amigos do G6 + 7 (Alim, Carol, Daniel, Lídia e crianças), pelas risadas e companheirismo imprescindíveis.

Ao meu marido, Romis, pelo apoio dado, pelos artigos baixados e por não ter desistido nos meus momentos de mau-humor.

Às minhas filhas, Clara e Marina, que tiveram uma mãe ainda mais chata e ausente, especialmente nos últimos meses.

À minha cãopanhia, Flora Florisbela, que acompanhou fielmente a redação de cada página deste documento.

A todos que torceram, incentivaram, acreditaram e aos que não atrapalharam, o meu muito obrigada!

“As aparências para a mente são de quatro tipos. As coisas ou são o que parecem ser; ou não são, nem parecem ser; ou são e não parecem ser; ou não são, mas parecem ser. Posicionar-se corretamente frente a todos esses casos é a tarefa do homem sábio”.

Epictetus, século II d.C.

RESUMO

REISCHAK, D. **Vírus da influenza aviária**: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil. [Avian influenza virus: monitoring in backyard poultry raised in the vicinity of concentration areas of migratory birds in Brazil]. 2016. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A influenza aviária é uma enfermidade viral causada por vírus influenza A que acomete várias espécies de aves. No Brasil, a influenza aviária é considerada uma doença exótica, uma vez que os subtipos H5 e H7 nunca foram detectados. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento realiza vigilância permanente para esta enfermidade nos plantéis comerciais de produção avícola e também em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias com o intuito de detectar precocemente a introdução dos subtipos H5 e H7 no país. No entanto, se desconhece a situação sanitária das aves de subsistência no que se refere à infecção por outros subtipos do vírus da influenza aviária. Considerando a importância deste tipo de criação como fonte de alimentos e de rendimentos em comunidades de baixa renda e o risco que provavelmente representa para a introdução da influenza aviária no Brasil, o objetivo deste trabalho foi monitorar as criações de aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no período de 2011 a 2015, a fim de verificar a circulação de todos os subtipos do vírus da influenza aviária (AIV). Foram colhidas amostras de soro e suabes de traqueia e cloaca de 2816 aves criadas em onze diferentes sítios de aves migratórias localizados em sete estados brasileiros, totalizando 391 explorações de fundo de quintal amostradas. As amostras de soro (n = 2716) foram submetidas a triagem para pesquisa de anticorpos para a proteína NP do influenza A utilizando-se um *kit* comercial de ELISA competitivo, com posterior subtipificação das amostras positivas pela técnica de inibição da hemaglutinação para os dezesseis subtipos do vírus influenza A. Os suabes de cloaca e traqueia foram submetidos à prova de PCR em tempo real para detecção do RNA do vírus influenza A. Não foram detectados anticorpos para os subtipos H5 e H7 do AIV, mas anticorpos para os subtipos H1, H3, H4, H6, H8, H9, H10, H12, H13 e H16 foram identificados em aves oriundas de nove dos onze sítios. O RNA do AIV foi detectado em apenas três amostras

pertencentes a uma mesma propriedade e nenhum vírus hemaglutinante foi isolado a partir deste material. Os resultados obtidos permitem concluir que os vírus de influenza aviária de baixa patogenicidade circulam em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil e alertam para a importância da ampliação da vigilância ativa nesta população.

Palavras-chave: Influenza aviária. Monitoramento. Aves de subsistência. Sítios de aves migratórias. Brasil.

ABSTRACT

REISCHAK, D. **Avian influenza virus**: monitoring in backyard poultry raised in the vicinity of concentration areas of migratory birds in Brazil. [Vírus da influenza aviária: monitoramento em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil]. 2016. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Avian influenza is a viral disease caused by an influenza A virus and affects various avian species. Avian influenza is considered an exotic disease in Brazil, since H5 and H7 notifiable subtypes have never been detected. The Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply carries out permanent surveillance for avian influenza in commercial poultry production flocks and also in backyard poultry raised in the vicinity of concentration areas of migratory birds with the purpose of detecting the early introduction of H5 and H7 subtypes in the country. However, the health status of backyard poultry in relation to infection by other avian influenza subtypes is unknown. Considering the importance of this kind of family production system as a source of food and revenue for low-income communities and the risk it probably represents for the introduction of avian influenza in Brazil, the aim of this work was monitoring backyard poultry raised in the vicinity of concentration areas of migratory birds from 2011 to 2015 to verify the circulation of all avian influenza virus (AIV) subtypes. Serum samples and cloacal and tracheal swabs were sampled from 2816 birds raised in eleven migratory birds concentration areas located in seven Brazilian states, totaling 391 backyard poultry flocks harvested. Serum samples (n = 2716) were screened using a commercial competitive ELISA kit to detect specific antibodies for the NP protein of the influenza A virus and afterwards the positive samples were subtyped through inhibition hemagglutination assay for the sixteen subtypes of influenza A viruses. Cloacal and tracheal swabs were tested by real-time PCR for detection of the influenza A virus RNA. No antibodies for H5 and H7 subtypes were detected, but antibodies for subtypes H1, H3, H4, H6, H8, H9, H10, H12, H13 e H16 have been identified in birds from nine out of eleven areas. The influenza A virus RNA was detected only in three samples from one flock and no hemagglutinating viruses were isolated from these specimens. Results obtained in this work suggest that low pathogenic avian influenza viruses are circulating in backyard poultry flocks

raised in concentration areas of migratory birds in Brazil and alert to the importance of the expansion of active surveillance in this population.

Keywords: Avian influenza. Monitoring. Backyard poultry. Migratory birds areas. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral do influenzavírus A	25
Figura 2 - As nove principais rotas migratórias do mundo.....	59
Figura 3 - Principais rotas de aves migratórias Brasil.....	61
Figura 4 - Fluxograma de trabalho empregado para as análises laboratoriais	74
Figura 5 - Localização geográfica dos municípios onde estão localizados os sítios de aves migratórias de onde foram colhidas amostras de aves de subsistência	87
Figura 6 - Interação entre as diferentes populações de aves e sua contribuição para a introdução da influenza aviária em sistemas comerciais de produção	104
Gráfico 1- Frequência de amostras positivas, de acordo com cada subtipo do IAV, detectadas na prova de HI, por UF de origem das amostras de soro	92
Quadro 1 - Métodos disponíveis para o diagnóstico laboratorial da influenza aviária de acordo com o propósito	42
Quadro 2 - Sítios de aves migratórias monitorados e critérios de seleção adotados de acordo com o Plano de Prevenção à Influenza Aviária	70

Quadro 3 - Número de explorações amostradas de galinhas, perus e codornas com relação ao número de explorações existentes na região estudada	71
Quadro 4 - Número de galinhas, perus e codornas amostrados em relação ao número de aves existentes em cada exploração	71
Quadro 5 - Número de explorações de anseriformes amostradas com relação ao número de explorações existentes na região estudada	72
Quadro 6 - Antígenos empregados para a realização da prova de inibição da hemaglutinação (HI) para pesquisa de anticorpos para o vírus da influenza aviária	80
Quadro 7 - Sequências dos pares de iniciadores e sondas para detecção do subtipo H7 do AIV	85
Quadro 8 - Sequências dos pares de iniciadores e sondas para detecção do subtipo H5 do AIV	85
Quadro 9 - Resultados obtidos à prova de HI para subtipificação das amostras positivas ao teste de cELISA AIV	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número de explorações e aves amostradas por sítio de acordo com a UF de origem.....	88
Tabela 2 - Número de aves amostradas por espécie de acordo com o sítio e a UF de origem.....	88
Tabela 3 - Frequência de amostras positivas e negativas ao teste de cELISA AIV por UF e sítio de origem	89
Tabela 4 - Número de amostras positivas e negativas ao teste de cELISA AIV de acordo com a espécie e o sítio de origem	91
Tabela 5 - Resultados obtidos à prova de qPCR AIV a partir de amostras de suabes de cloaca e traqueia, de acordo com o sítio e a UF de origem	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µl	Microlitro
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ADAB	Agência de Defesa Agropecuária da Bahia
ADAGRO	Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco
ADEPARA	Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará
AGID	Ágar-gel imunodifusão
AI	Influenza aviária (<i>Avian influenza</i>)
AIV	Vírus da influenza aviária (<i>Avian influenza virus</i>)
APHIS	<i>Animal and Plant Health Inspection Service</i>
BA	Bahia
CDA	Coordenadoria de Defesa Agropecuária de São Paulo
cELISA	Ensaio enzimático imunoabsorvido competitivo
cELISA AIV	Ensaio enzimático imunoabsorvido competitivo para pesquisa de anticorpos para a proteína NP do AIV
CFSPH	Centro de Segurança Alimentar e Saúde Pública (<i>Center for Food Security and Public Health</i>)
CI-Brasil	Conservação Internacional Brasil
CIDASC	Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina
CSA	Coordenação de Sanidade Avícola
C _t	Limiar do ciclo (<i>Cycle threshold</i>)
ELISA	Ensaio enzimático imunoabsorvido (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EUA	Estados Unidos da América
HA	Hemaglutinação
HI	Inibição da hemaglutinação (<i>Hemagglutination inhibition</i>)
HPAI	Influenza aviária de alta patogenicidade (<i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i>)
IAGRO	Agência Estadual de Defesa Sanitária Animal e Vegetal de Mato Grosso do Sul

IAV	Vírus influenza A (<i>Influenza A virus</i>)
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>)
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IgY	Imunoglobulina Y
ISZVe	<i>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie</i>
IVPI	Índice de patogenicidade intravenosa (<i>Intravenous Pathogenicity Index</i>)
Lanagro-SP	Laboratório Nacional Agropecuário no Estado de São Paulo
LPAI	Influenza aviária de baixa patogenicidade (<i>Low Pathogenic Avian Influenza</i>)
M1	<i>Matrix protein 1</i>
M2	<i>Membrane ion channel protein</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ml	Mililitros
MT	Mato Grosso
NA	Neuraminidase
ND	Doença de Newcastle (<i>Newcastle Disease</i>)
NI	Inibição da neuraminidase (<i>Neuraminidase Inhibition</i>)
NP	Nucleoproteína
NS-1	<i>Non-structural protein 1</i>
NS-2	<i>Non-structural protein 2</i>
NVSL	<i>National Veterinary Services Laboratories</i>
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal (<i>World Organisation for Animal Health</i>)
PA	Pará
PA	Polimerase (<i>Polymerase</i>)
PB1	<i>Polymerase basic protein 1</i>
PB1-F2	<i>PB1-F2 protein</i>
PB2	<i>Polymerase basic protein 2</i>

PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PE	Pernambuco
pH	Potencial de hidrogênio
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
ppt	Partes por trilhão
qPCR	PCR em tempo real (<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
qPCR AIV	PCR em tempo real para detecção do ácido nucleico do AIV
qPCR H5	PCR em tempo real para detecção do ácido nucleico do subtipo H5
qPCR H7	PCR em tempo real para detecção do ácido nucleico do subtipo H7
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RS	Rio Grande do Sul
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SC	Santa Catarina
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SEAPI	Secretaria de Agricultura, Pecuária e Irrigação do Rio Grande do Sul
SFA	Superintendência Federal de Agricultura
SIFISA	Serviço de Fiscalização, Inspeção e Saúde Animal
SISA	Serviço de Inspeção e Saúde Animal
SP	São Paulo
SPF	Livre de patógenos específicos (<i>Specific Pathogen Free</i>)
SSA	Serviço de Saúde Animal
SVO	Serviço Veterinário Oficial
UF	Unidade Federativa
UFs	Unidades Federativas
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (<i>United States Department of Agriculture</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1	INFLUENZA AVIÁRIA	24
2.1.1	Etiologia	24
2.1.2	Epidemiologia.....	27
2.1.3	Resposta imune	30
2.1.4	Transmissão.....	31
2.1.5	Persistência ambiental.....	32
2.1.6	Ocorrência	34
2.1.7	Manifestação clínica	39
2.1.8	Diagnóstico laboratorial.....	41
2.1.8.1	Métodos diretos	43
2.1.8.1.1	<i>Isolamento e identificação viral.....</i>	43
2.1.8.1.2	<i>Ensaio imunoenzimático de captura de antígeno.....</i>	45
2.1.8.1.3	<i>Detecção de ácido nucleico viral.....</i>	46
2.1.8.2	Métodos indiretos	48
2.1.8.2.1	<i>Ensaio enzimático imunoabsorvido (ELISA)</i>	48
2.1.8.2.2	<i>Ágar-gel imunodifusão</i>	50
2.1.8.2.3	<i>Inibição da hemaglutinação.....</i>	51
2.2	AVICULTURA DE SUBSISTÊNCIA.....	52
2.2.1	Importância socioeconômica	53
2.2.2	Papel das aves de subsistência na epidemiologia da influenza aviária	54
2.2.3	Importância da interação das aves de subsistência com aves silvestres.....	56
2.3	AVES MIGRATÓRIAS E INFLUENZA AVIÁRIA.....	57
2.3.1	A migração	57
2.3.2	Rotas migratórias	58
2.3.3	Papel das aves migratórias na epidemiologia da influenza aviária....	60
2.4	VIGILÂNCIA ATIVA PARA INFLUENZA AVIÁRIA.....	62

2.4.1	Vigilância em aves de subsistência.....	62
2.4.2	Vigilância em aves migratórias.....	64
3	MATERIAIS E MÉTODOS	69
3.1	AMOSTRAS.....	69
3.2	ENSAIOS LABORATORIAIS	73
3.2.1	cELISA	74
3.2.1.1	Interpretação dos resultados	75
3.2.2	Prova de inibição da hemaglutinação.....	76
3.2.2.1	Hemaglutinação (HA)	76
3.2.2.2	Preparo dos antígenos para a prova de HI.....	77
3.2.2.3	Preparo das amostras de soro	77
3.2.2.4	Prova de HI	78
3.2.2.5	Interpretação dos resultados	79
3.2.3	Real Time PCR para detecção de ácidos nucleicos dos vírus influenza A e dos subtipos H5 e H7.....	80
3.2.3.1	Extração automatizada de ácidos nucleicos totais	80
3.2.3.2	PCR em tempo real para detecção de ácido nucleico de influenza A	81
3.2.3.3	PCR em tempo real para detecção de ácido nucleico dos subtipos H5 e H7	82
3.2.3.4	Interpretação dos resultados	84
4	RESULTADOS	86
4.1	AMOSTRAS.....	86
4.2	PESQUISA DE ANTICORPOS PARA A PROTEÍNA NP POR cELISA	89
4.3	PROVA DE HI	90
4.4	PCR EM TEMPO REAL PARA INFLUENZA A.....	95
5	DISCUSSÃO.....	96
6	CONCLUSÕES.....	115
	REFERÊNCIAS	116

1 INTRODUÇÃO

A influenza aviária é uma enfermidade viral causada por um vírus influenza A que acomete várias espécies de aves e que é denominado popularmente de vírus da influenza aviária (AIV). Os vírus influenza A são classificados em subtipos de acordo com as características antigênicas das proteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). São reconhecidos 16 subtipos de HA e nove subtipos de NA e a maioria das combinações possíveis já foi isolada de várias espécies de aves. Os vírus influenza A que infectam aves domésticas podem ser divididos em vírus de alta patogenicidade e vírus de baixa patogenicidade de acordo com a habilidade que possuem em causar doença, sendo que, até o momento, a influenza aviária de alta patogenicidade está associada apenas aos subtipos H5 e H7 do AIV.

O Brasil possui, atualmente, um papel de destaque na cadeia de produção avícola. No ano de 2015, segundo dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), o Brasil foi o segundo maior produtor de carne de frango do mundo e o líder mundial em exportações deste produto (ABPA, 2016). O êxito da produção deve-se não só a fatores como mão-de-obra barata, altos investimentos em melhoramento genético, condições climáticas favoráveis e abundância em grãos, mas também ao estado sanitário do plantel avícola nacional.

A Portaria Ministerial nº 193 de 19 de setembro de 1994, consolidou e estruturou o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), considerando a importância da produção avícola brasileira no contexto nacional e internacional e a necessidade de normatização das ações de acompanhamento sanitário relacionadas ao setor. A partir deste momento, ações de vigilância epidemiológica e sanitária passaram a ser executadas pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO) para o controle e/ou erradicação das enfermidades contempladas no PNSA: salmoneloses e micoplasmoses aviárias, doença de Newcastle (*Newcastle disease* - ND) e influenza aviária (*Avian influenza* - AI).

A partir da publicação da Instrução Normativa SDA nº 32, de 13 de maio de 2002, que aprovou as normas técnicas de vigilância para doença de Newcastle e

influenza aviária, e de controle e erradicação para a doença de Newcastle, o MAPA iniciou um Programa de Vigilância Ativa que foi executado em duas fases. Ao final da primeira fase, realizada em plantéis avícolas de áreas produtoras de frangos de corte, foi publicada a Instrução Normativa nº 11, de 1º de setembro de 2003, declarando os plantéis avícolas industriais dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e do Distrito Federal livres da doença de Newcastle (ORSI et al., 2010).

Na segunda fase do programa de vigilância, executada entre 2006 e 2007, três distintas populações foram estudadas: aves comerciais de corte de criação intensiva, aves de reprodução e aves migratórias e de subsistência. Não houve identificação de resposta sorológica ou isolamento de vírus da influenza aviária (*Avian Influenza Virus* - AIV) nas duas primeiras populações. No entanto, foram isolados vírus de influenza do subtipo H3 a partir de aves migratórias capturadas nos estados de Pará e Pernambuco. Também foram identificados AIV dos subtipos H2, H3 e H4 em aves de subsistência oriundas de propriedades localizadas no Amazonas, Pará, Pernambuco, Rio Grande do Sul e Santa Catarina. Segundo Mota et al. (2013), os resultados observados sugerem risco sanitário para influenza aviária de baixa patogenicidade associado às populações de aves silvestres e de subsistência localizadas em áreas próximas ao sistema comercial.

Apesar dos relatos mencionados acima, a influenza aviária é considerada uma enfermidade exótica no Brasil, já que não existem evidências, até o momento, da detecção da influenza aviária de alta patogenicidade (*Highly Pathogenic Avian Influenza* - HPAI) em território nacional.

Ao contrário da avicultura comercial, a avicultura denominada de subsistência se realiza no meio rural e em áreas marginais (JIMENEZ, 2007) e é uma atividade pecuária que aproveita ao máximo a mão de obra familiar.

De acordo com Guèye (2005), a avicultura de subsistência, também denominada de avicultura familiar, é praticada por diferentes grupos étnicos e as aves são mantidas por diversas razões, já que sua criação possui uma importância simbólica dentro do contexto de muitas atividades sociais, culturais e religiosas.

Segundo IQBAL (2009) nos países em desenvolvimento a criação de aves de fundo de quintal não é apenas um passatempo. A criação destas aves contribui para

a captação de renda e para a subsistência de muitas famílias rurais. Devido ao baixo custo e ao retorno rápido, quase todas as famílias mantêm um pequeno plantel avícola que é, usualmente, mantido por mulheres e por crianças. Aves de fundo de quintal contribuem com carne e ovos e, em períodos de dificuldade, podem significar a diferença entre a vida e a morte. Atualmente, no entanto, esta equação vida e morte tem uma variável adicional: o risco de infecção humana por vírus de influenza de origem aviária, particularmente com o subtipo H5N1 (PEIRIS; DE JONG; GUAN, 2007). A maioria dos criadores de aves de fundo de quintal podem desconhecer medidas básicas de biossegurança e o risco que algumas enfermidades animais podem representar para os humanos. Aves doentes podem ser manuseadas, vendidas, abatidas e consumidas sem que seja levada em consideração que a infecção que fez a ave adoecer pode, potencialmente, também ser letal para o homem.

O contato estreito entre aves de subsistência e aves migratórias ou silvestres, especialmente aves aquáticas, assim como com aves de produção localizadas em propriedades vizinhas, pode resultar na transmissão de inúmeros agentes infecciosos (HADIPOUR, 2010), como o AIV, mas pouco se conhece sobre a situação sanitária das criações de subsistência.

Além disso, aves de subsistência que possuam contato estreito com aves migratórias ou silvestres, podem ter um importante papel na transmissão e amplificação da virulência do AIV a campo, já que permitem a sobrevivência do vírus no ambiente e podem contribuir para a difusão deste aos plantéis comerciais (HADIPOUR; HABIBI; VOSOUGUI, 2011).

Apesar da vigilância epidemiológica e sanitária para influenza aviária realizada pelo MAPA, se desconhece no País a situação sanitária das aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no que se refere à infecção pelos diferentes subtipos do vírus da influenza aviária, uma vez que as análises de rotina são centradas, principalmente, na detecção dos subtipos H5 e H7 do AIV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLUENZA AVIÁRIA

2.1.1 Etiologia

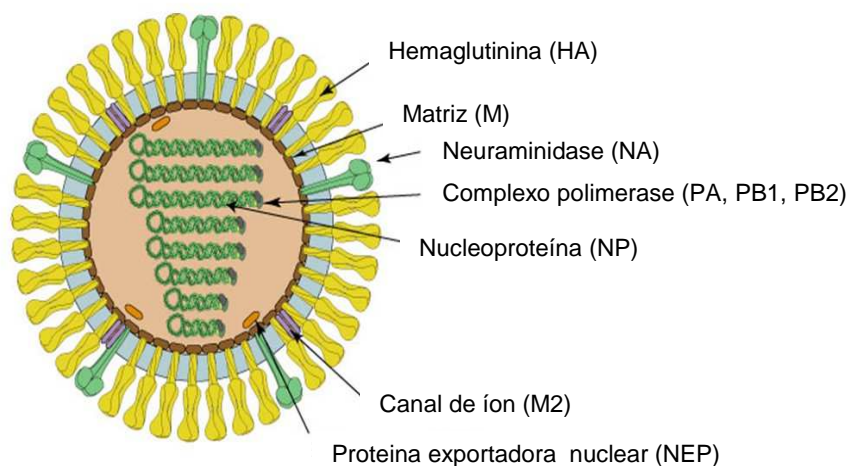
A influenza aviária é causada por vírus pertencentes à família *Orthomyxoviridae* e ao gênero *influenzavirus A* (ICTV, 2015). Estes vírus são envelopados e possuem RNA de fita simples segmentado e de sentido negativo. O grupo inclui três tipos de vírus influenza: A, B e C. Os tipos B e C infectam apenas humanos, mas o tipo A infecta humanos, equinos, suínos, outros mamíferos e uma variedade de aves domésticas e selvagens. No entanto, as aves aquáticas selvagens, gaivotas e outras aves marinhas são consideradas hospedeiros naturais do vírus (WEBSTER et al., 1992).

Os vírus influenza A possuem de 80 a 120 nm, são pleomórficos e a partícula viral consiste de um envelope constituído de uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro no qual as glicoproteínas codificadas pelo vírus, hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA) e M2, estão incorporadas (WEBSTER et al., 1992). O genoma dos vírus influenza A consiste de oito segmentos de RNA de fita simples e polaridade negativa, sendo que cada segmento está associado a múltiplas cópias de nucleoproteína (NP) e à polimerase viral (constituída de PB1, PB2 e PA), formando o complexo ribonucleoproteína (RNP) que, por sua vez, se encontra circundado por uma camada de proteína matriz (ZHENG; TAO, 2013).

Os influenzavírus A são subdivididos em subtipos de acordo com as relações antigênicas das glicoproteínas de superfície, HA e NA. Até o momento, 16 subtipos de HA e nove subtipos de NA foram relatados, sendo que dois novos subtipos de HA (H17 e H18) e um novo subtipo de NA (N10) foram propostos após detecção em morcegos na Guatemala (TONG et al., 2012; ZHU et al., 2012; TONG et al., 2013).

Cada vírus possui um tipo de HA e um tipo de NA, em qualquer combinação (CATTOLI; MONNE, 2009).

Figura 1 - Representação esquemática da partícula viral do influenzavírus A



Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6.html, adaptação de Reischak (2016)

Os oito segmentos genômicos dos vírus influenza A codificam para nove proteínas estruturais (PB1, PB1-F2, PB2, PA, HA, NA, NP, M1 e M2) e duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2). Estes segmentos genômicos se encontram contidos dentro do capsídeo viral composto de nucleoproteína (NP) helicoidalmente organizada (KAPOOR; DHAMA, 2014). A matriz composta por proteína M1 é interceptada por canais de íons constituídos de proteína M2 e encontra-se na parte interna do envelope viral. A proteína HA tem como função a hemaglutinação e a aderência do vírus à célula do hospedeiro. A proteína NA possui atividade enzimática, auxiliando na liberação dos virions das células devido a sua ação sobre os receptores de ácido siálico. As proteínas PB1, PB2 e PA são componentes da RNA polimerase viral e são responsáveis pela replicação e transcrição do RNA.

Os vírus influenza A possuem dois mecanismos primários que propiciam diversidade na população viral: uma alta taxa de mutação, por falta de mecanismos de reparo da RNA polimerase, e a habilidade em rearranjar segmentos de genes.

Ambos mecanismos propiciam ao vírus uma oportunidade de rapidamente mutar e se adaptar, contribuindo para sua habilidade em estabelecer infecções em novos hospedeiros (SUAREZ, 2008).

A gradual variação antigênica por aquisição de pontos de mutação ao longo do tempo é chamada de *drift* antigênico, mecanismo este comumente associado às epidemias anuais de influenza. Já o *shift* antigênico é uma mudança abrupta que ocorre pelo intercâmbio (rearranjo) de genes entre diferentes subtipos virais. Neste caso, um vírus influenza A adquire segmentos de HA e/ou de NA de um vírus pertencente a outro subtipo, levando a uma mudança completa na estrutura antigênica e emergência de novos subtipos virais (ABDELWHAB; VEITS; METTENLEITER, 2013).

A proteína HA dos vírus HPAI pode ser clivada por proteases endógenas encontradas em células de vários sistemas orgânicos, enquanto a HA dos vírus de baixa patogenicidade podem ser clivadas apenas por enzimas tripsina-like que são primariamente encontradas nos trato entérico e respiratório (SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2008).

As alterações de patogenicidade nos vírus influenza A que acometem aves estão associadas a mudanças no sítio de clivagem proteolítico da hemaglutinina, incluindo: 1) substituições de aminoácidos não-básicos por básicos (arginina e lisina); 2) inserções de múltiplos aminoácidos básicos de códons duplicados do sítio de clivagem da hemaglutinina; 3) pequenos insertos de aminoácidos básicos e não-básicos de origem desconhecida; 4) recombinação com insertos de outros segmentos de genes que alongam o sítio de clivagem proteolítica; e 5) perda do ponto de glicosilação protetora no resíduo 13 em combinação com múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem (OIE, 2015).

Segundo o Código Sanitário para Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (2016), a influenza aviária é definida como uma infecção de aves domésticas causada por qualquer vírus influenza A dos subtipos H5 e H7 ou por qualquer vírus influenza A com um índice de patogenicidade intravenosa (IVPI) maior do que 1.2. Portanto, o termo geral “influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI)” e o termo histórico “peste aviária” referem-se a infecções com amostras altamente patogênicas de vírus influenza A, sendo necessário avaliar a

patogenicidade dos isolados virais para aves domésticas. Embora, até o presente momento, todas as amostras virais isoladas de casos naturais de HPAI sejam dos subtipos H5 ou H7, a maioria desses dois subtipos virais isolados a campo tem sido caracterizada como de influenza aviária de baixa patogenicidade (OIE, 2015).

A influenza aviária é uma enfermidade notificável, sendo que quaisquer casos de alta patogenicidade em quaisquer espécies de aves, incluindo as silvestres, devem ser notificados à OIE. Infecções por vírus de baixa patogenicidade não-H5 e não-H7 não são definidos como influenza aviária e, portanto, não são notificáveis (OIE, 2015).

No Brasil, a influenza aviária está contemplada na Instrução Normativa nº 50 de 24 de setembro de 2013, constando na lista de doenças nunca registradas no país e que requerem notificação imediata, no prazo máximo de 24 horas de seu conhecimento, de qualquer caso suspeito ou diagnóstico laboratorial.

De acordo com a Instrução Normativa nº 32 de 13/05/2002, o diagnóstico laboratorial da influenza aviária no Brasil só pode ser realizado pelos laboratórios oficiais ou por laboratórios credenciados pelo MAPA para este fim, sendo que os resultados devem ser confirmados pelo laboratório nacional de referência (Lanagro-SP).

2.1.2 Epidemiologia

As aves aquáticas, principalmente aquelas pertencentes às ordens Anseriformes (patos, gansos e cisnes) e Charadriiformes (maçaricos, gaivotas e andorinhas) são reconhecidas como reservatórios naturais dos vírus influenza A (WEBSTER et al., 1992; OLSEN et al., 2006).

A diversidade de espécies nestas ordens é grande e a distribuição de casos relatados de influenza aviária dentro destes grupos está associado com famílias específicas e, em alguns casos, com indivíduos de uma determinada espécie. Dentre os Anseriformes, muitos isolamentos de AIV foram relatados de membros da subfamília Anatinae (patos nadadores e mergulhadores), sendo que a quantidade de

relatos é maior em patos-reais (*Anas platyrhynchos*) do que em qualquer outra espécie. Dentre os Charadriiformes, o AIV foi isolado de três diferentes famílias, mas muitos isolamentos estão associados a espécies das famílias Scolopacidae (maçaricos e vira-pedras) e Laridae (gaivotas e andorinhas-do-mar) (STALLKNECHT; BROWN, 2008).

O padrão de infecção por influenza em Charadriiformes difere levemente daquele encontrado em Anseriformes. Os subtipos H13 e H16 de hemaglutinina, por exemplo, foram isolados quase que exclusivamente de Charadriiformes (VANDEGRIFT et al., 2010). Outra diferença reside na variação espacial e temporal da infecção. Enquanto a prevalência da infecção por AIV nas populações de patos da América do Norte atinge seu pico no final do verão e início de outono, com taxas que podem ultrapassar 30% nas aves jovens, o pico de prevalência nas aves costeiras ocorre na primavera, com um pico menor no outono (KAWAOKA et al., 1988). Padrão similar foi observado também na Eurásia (OLSEN et al., 2006),

Supõe-se que a variação sazonal na prevalência da infecção por influenza é dada pelo influxo e agregação de aves jovens susceptíveis após o período de reprodução e antes ou durante o período de migração e pode também ser influenciada pelas condições ambientais que determinam a sobrevivência do vírus fora do hospedeiro (STALLKNECHT et al., 1990b)

Patos selvagens e aves costeiras foram monitorados na América do Norte por 26 e 16 anos, respectivamente. As amostras das aves costeiras foram obtidas na Península de Delmarva, enquanto as amostras de patos selvagens foram colhidas em Alberta, Canadá. Nas aves costeiras, uma maior frequência de isolamento do AIV foi obtida durante o período de migração ao norte, enquanto para os patos selvagens a maior frequência de isolamento se deu durante o período de migração para o sul. Além disso, as aves costeiras apresentaram um maior número de diferentes combinações HA-NA (26 das 90 encontradas) do que os patos selvagens, sugerindo que estas aves sejam a principal fonte de alguns subtipos virais detectados com menor frequência em patos selvagens, como é o caso do subtipo H5 (KRAUSS et al., 2004).

Assim, mesmo que as aves marinhas tenham uma menor prevalência de infecção por influenza do que os patos durante a migração, o potencial de

distribuição global dos vírus e o fluxo de genes virais pode ser afetado pelos movimentos destas aves. Ainda que raro, as consequências de uma disseminação mediada por aves marinhas podem ser importantes, pois estas migram por distâncias muito maiores que os anseriformes e conectam várias regiões geográficas, coisa que os anseriformes não fazem (VANDEGRIFT et al., 2010).

O papel das aves canoras e de outras aves silvestres como portadoras do AIV foi alvo de estudo realizado nos Estados Unidos por Fuller et al. (2010). Cento e cinquenta e duas espécies de passeriformes foram testadas e 22 delas resultaram positivas para AIV por PCR em tempo real, sendo a prevalência nestas espécies maior do que aquela encontrada em aves pertencentes a outras ordens, como Falconiformes e Piciformes. Os resultados encontrados sugerem que as aves canoras silvestres constituem um importante hospedeiro natural do vírus influenza A nos EUA e, a exemplo das aves domésticas e aquáticas, também deveriam ser monitoradas como potenciais vetores a humanos e a outras aves.

A importância dos passeriformes na ecologia e manutenção dos vírus influenza A também já havia sido citada por Nestorowicz et al. (1987) quando um vírus H7N7 de alta patogenicidade isolado de um estorninho, após um surto em uma propriedade de aves domésticas na Austrália, foi capaz de causar mortalidade em galinhas, estorninhos e pardais infectados experimentalmente.

Os Galiformes, especialmente galinhas e perus, assim como os mamíferos, representam hospedeiros anormais do AIV (SUAREZ; SCHULTZ-CHERRY, 2000)

Ainda não está completamente esclarecido como os vírus influenza A se mantêm na natureza, mas algumas evidências observadas em patos selvagens suportam a existência de um ciclo de manutenção baseado nos efeitos combinados da transmissão contínua ave a ave e da persistência ambiental em áreas de reprodução e de não reprodução (STALLKNECHT; BROWN, 2008).

Mudanças ambientais antropogênicas, como desenvolvimento da agricultura, uso da terra, globalização e alterações climáticas, estão contribuindo para alterar a ecologia e a evolução do vírus da influenza aviária. A crescente diminuição dos mananciais de águas superficiais, por exemplo, seja por avanço da agricultura, por aumento da evaporação em virtude das alterações climáticas ou por aumento de demanda por água potável, poderá diminuir significativamente a disponibilidade

global de habitats naturais para as aves aquáticas no futuro. Com isso, aves aquáticas precisarão se adaptar a novos habitats, levando a uma maior densidade de aves em áreas antes não usuais, estresse e maior proximidade a aves domésticas, o que poderá ocasionar um incremento de transmissão da influenza entre grupos de aves e um aumento na transmissão entre espécies (VANDEGRIFT et al., 2010).

Além disso, alterações associadas ao clima podem interferir na distribuição, composição e comportamento migratório das aves aquáticas, podendo causar importantes mudanças na epidemiologia da influenza aviária (VANDEGRIFT et al., 2010).

2.1.3 Resposta imune

A interação entre o vírus da influenza aviária e o sistema imune do hospedeiro se inicia com a aderência da proteína HA a resíduos de ácido siálico encontrados nas células que revestem a superfície das mucosas. Em aves, os vírus influenza A se fixam, preferencialmente, ao ácido siálico ligado à galactose por ligações do tipo α -2,3. Esta interação resulta na internalização do vírus e na infecção da célula hospedeira (SWAYNE; KAPCZYNSKI, 2008; PILLAI; LEE, 2010).

O sistema imune de todos os vertebrados, incluindo as aves, é dividido em dois segmentos: imunidade humoral e imunidade celular. Nas aves, a imunidade humoral, caracterizada pela secreção de anticorpos pelos linfócitos B, está sob o controle da bursa de Fabrícus, enquanto a imunidade celular está sob controle do timo, órgão essencial para a maturação dos linfócitos T. Outras células também são importantes para a imunidade celular, como macrófagos, células dendríticas, células *natural killer* e células efectoras dependentes de anticorpos (SHARMA, 1991).

Três classes de anticorpos foram descritas em aves: IgM, IgA e IgY, sendo esta última homóloga à IgG de mamíferos. IgM e IgY podem ser detectadas no soro, enquanto IgA é expressa em uma variedade de secreções corporais (SHULTZ; MAGOR, 2008).

As proteínas de superfície HA, NA e M2 são os únicos antígenos capazes de induzir anticorpos neutralizantes e, conseqüentemente, uma resposta imune protetora. Anticorpos para a proteína HA são os principais determinantes para a proteção do hospedeiro. Os diferentes subtipos virais induzem a produção de anticorpos capazes de neutralizar outros vírus com o mesmo subtipo de HA e NA, mas que não neutralizam vírus com subtipos diferentes destas proteínas. Resposta humoral também é produzida para as proteínas internas, especialmente para M1 e NP. Estas duas proteínas são importantes antígenos quando empregados em testes de diagnóstico, uma vez que são altamente conservados e permitem a detecção de anticorpos em aves infectadas com qualquer vírus influenza A (SUAREZ; SCHULTZ-CHERRY, 2000).

A expressão da proteína NP na superfície das células infectadas por vírus influenza A se dá anteriormente à expressão da proteína HA (YEWDELL et al., 1985; PROKUDINA; SEMENOVA, 1991). Como resultado, anticorpos para NP podem ser detectados antes daqueles dirigidos para HA. Em galinhas experimentalmente infectadas com um vírus H5N3, anticorpos para NP foram detectados por ELISA competitivo aos sete dias pós-infecção, enquanto resposta positiva à inibição da hemaglutinação com antígeno homólogo foi observada apenas 14 dias pós-infecção (YANG et al., 2011). Já em patos experimentalmente infectados com diferentes subtipos de vírus influenza A anticorpos para NP atingiram seu pico mais precocemente (10 dias pós-infecção) do que anticorpos para HA (14-21 dias pós-infecção), ainda que estes últimos tenham perdurado por mais tempo (MARCHÉ; VAN DEN BERG; LAMBRECHT, 2016).

2.1.4 Transmissão

A transmissão do AIV de ave a ave é extremamente complexa e depende da estirpe viral, da espécie da ave e de fatores ambientais. Duas principais rotas estão envolvidas na transmissão do AIV: a transmissão direta e a transmissão via água (ALEXANDER, 2007; ROCHE et al., 2009)

Em aves selvagens aquáticas, os vírus de baixa patogenicidade infectam, principalmente, as células do trato intestinal e são excretados em altas concentrações nas fezes. Baseados nos relatos de isolamento de vírus influenza a partir de material fecal fresco e de água não concentrada de lagos, Webster et al. (1992) indicam que as aves aquáticas possuem uma forma muito eficiente de transmissão: via matéria fecal presente na água de superfície. Esse mecanismo permite que as aves jovens de uma população se infectem e também que o vírus se difunda a outras aves silvestres e domésticas.

A excreção via trato respiratório também é considerada importante, pelo menos para algumas espécies de aves ou algumas estirpes virais, como é o caso do H5N1 asiático de alta patogenicidade (CATTOLI; MONNE, 2009). Os autores (MUNSTER; FOUCHIER, 2009) também comentam que a transmissão por via respiratória pode ser relevante para espécies de aves nas quais a transmissão fecal-oral seria mais difícil. Sendo assim, diferenças de comportamento entre espécies poderiam selecionar vírus que podem alterar a via de transmissão de fecal-oral para respiratória.

Diferenças nos hábitos alimentares e na dieta de algumas espécies e famílias de aves podem também contribuir para a eficiência de transmissão do vírus. Enquanto patos se alimentam em águas de superfície, gansos e algumas espécies de cisnes buscam alimento em pastos e campos agrícolas. Esse hábito diferenciado poderia levar a uma forma potencialmente menos eficiente de transmissão nestas espécies, explicando uma menor prevalência e menor diversidade de subtipos detectados em gansos, por exemplo (MUNSTER; FOUCHIER, 2009).

2.1.5 Persistência ambiental

Várias possibilidades foram sugeridas por Webster et al. (1992) para a perpetuação dos vírus influenza em populações de aves aquáticas no mundo: a circulação contínua em espécies de aves aquáticas, a circulação entre diferentes

espécies de aves, a persistência do vírus na água ou no gelo, a persistência em animais individuais e a circulação contínua em regiões subtropicais e tropicais.

A transmissão e persistência do AIV entre espécies selvagens permanece um assunto não resolvido, uma vez que depende tanto da ecologia do hospedeiro (densidade da população, migração), como do ambiente (persistência na água). Roche et al. (2009) desenvolveram um modelo matemático que leva em consideração tanto a epidemiologia do AIV quanto a dinâmica da população de aves. Os resultados sugerem que os padrões de transmissão são densidade-dependentes e envolvem também a transmissão pela água, sendo essa última a principal determinante da dinâmica da doença. Tais resultados ressaltam a importância da persistência das partículas virais na água na dinâmica da infecção pelo AIV em aves selvagens.

A persistência do AIV na água e sua importância para a manutenção do agente na população de aves aquáticas foi estudada por Stallknecht et al. (1990b). Cinco diferentes subtipos do AIV foram diluídos em água destilada e mantidos em câmaras a 17°C e 28°C a fim de simular as temperaturas médias do inverno e do verão na costa da Louisiana, nos Estados Unidos, de onde os vírus foram isolados de patos. O vírus H10N7 foi mantido também a 4°C. Alíquotas da água inoculada com cada um dos subtipos e submetida a cada uma das temperaturas foram feitas por um período de 60 dias. Os autores verificaram que, sob condições experimentais, o vírus poderia persistir por mais de 100 dias em água destilada à 28°C e 200 dias à 17°C.

Os mesmos autores (STALLKNECHT et al., 1990a) avaliaram os efeitos do pH, temperatura e salinidade na persistência de três subtipos do vírus da influenza aviária na água. A persistência do AIV em água de superfície também foi avaliada e comparada com o modelo de água destilada utilizado no trabalho anterior. Os autores avaliaram três faixas de pH (representativas dos valores encontrados nas águas de superfície dos Estados Unidos), dois níveis de salinidade (correspondente a águas frescas e salobras) e duas faixas de temperatura (representando as médias de temperatura no inverno e no verão na costa da Louisiana). A água de superfície utilizada foi coletada em habitats típicos de aves aquáticas localizados em Louisiana. De forma resumida, diferenças de infectividade foram detectadas entre temperatura,

salinidade e pH, com uma forte interação entre salinidade e pH. A maior persistência de infectividade foi observada no tratamento 17°C/0 ppt/pH 8.2 (100 dias) e a mais curta em 28°C/20 ppt/pH 8.2 (9 dias). A resposta a estas variáveis também diferiu entre os diferentes subtipos do vírus. Os resultados encontrados para água de superfície foram consistentes com aqueles do modelo água destilada, ou seja, decréscimo na infectividade com o aumento de salinidade e pH.

2.1.6 Ocorrência

O vírus da influenza aviária, segundo Swayne (2008a), é um vírus global que não conhece fronteiras geográficas, não possui agenda política e pode infectar aves domésticas comerciais e não comerciais, aves criadas em sistemas intensivos ou extensivos, aves de companhia, aves silvestres e uma variedade de espécies aviárias e não aviárias.

Os vírus influenza A se encontram amplamente difundidos na natureza e já foram detectados em mais de 105 diferentes espécies pertencentes a 26 famílias de aves selvagens (OLSEN et al., 2006). As aves selvagens aquáticas são hospedeiras naturais e podem tornar-se infectadas por vírus de todos os subtipos de HA e NA sem apresentarem sinais clínicos da doença.

Em uma revisão feita por (ALEXANDER; BROWN, 2009) sobre a história da influenza aviária de alta patogenicidade, os autores mencionam que a data mais antiga e amplamente citada para o início da história registrada da influenza aviária é 1878, quando Perroncito, na Itália, descreveu uma enfermidade com alta mortalidade que estava acometendo galinhas e outras aves domésticas. Os autores observam que, considerando a história da domesticação das aves, é improvável que esta tenha sido a primeira ocorrência da enfermidade, mas salientam que a importância desse relato está no fato de que foi a primeira vez que a influenza foi diferenciada de enfermidades bacterianas como a cólera aviária.

Vários surtos de influenza aviária foram e vem sendo relatados desde o início do século XX. Em uma ampla revisão realizada por Kaleta e Rülke (2008) sobre o

início e disseminação da HPAI na Europa e Ásia dentre 1878 e 1955, os autores concluem que as publicações desta época fornecem evidências para a existência de três epidemias da então chamada *fowl plague*.

A primeira epidemia teria acontecido entre 1877 e 1880, estando restrita ao norte da Itália, onde muitas criações de galinhas ficavam localizadas próximas à mananciais de água visitados por aves de vida livre, especialmente aquáticas. A segunda epidemia teria iniciado mais uma vez no norte da Itália entre 1899 e 1906. Nesta ocasião, galinhas da Itália participaram de uma exposição de aves em Brunswick, Alemanha, resultando na disseminação da enfermidade neste país, na Áustria e em países vizinhos. Já a terceira epidemia teria ocorrido entre 1919 e 1931 sendo o caso inicial, mais uma vez, identificado no norte da Itália de onde a enfermidade se disseminou pela Europa através do comércio de aves vivas e, possivelmente, do trânsito de equipamentos contaminados. Segundo os autores, os relatos na Ásia são escassos e apenas uma publicação do Japão, de 1942, menciona a observação da *fowl plague* em galinhas e em gatos domésticos que foram acidentalmente afetados.

Quatorze surtos de influenza aviária ocorreram na Europa, Ásia e África entre 1959 e 2006, excluindo os surtos asiáticos de H5N1, e foram compilados em uma revisão realizada por Alexander, Capua e Kock (2008). O surto de 1959, em uma granja próxima a Aberdeen, Escócia, tem especial importância histórica por ter sido a primeira vez em que foi isolado um vírus de influenza do subtipo H5, o primeiro vírus patogênico não-H7.

Já sobre a ocorrência de influenza aviária nas Américas, os primeiros casos da enfermidade foram relatados nos anos 1920. No entanto, em uma ampla revisão realizada por Swayne (2008b) sobre esse assunto, o autor menciona que muitos casos ou surtos nas Américas foram pobremente documentados ou mesmo podem não ter sido relatados, uma vez que existiam limitações quanto ao diagnóstico e insuficiente conhecimento ou treinamento para reconhecer a enfermidade.

Nove diferentes surtos de HPAI nas Américas foram bem documentados no período de 1924 a 2007 e alvo da revisão realizada por Swayne (2008b): nos Estados Unidos (1924-25, 1929, 1983-84 e 2004), no Canadá (1966, 2004 e 2007), no México (1994-95) e no Chile (2002). O autor também comenta em sua revisão

que existe um relato de 1926, feito por J.R. Mohler, que menciona surtos de *fowl plague* na Argentina e no Brasil. No entanto, salienta que as informações deste relato são mínimas e que não foi possível rastrear os dois autores latinos citados por Mohler.

Na Austrália, cinco surtos de influenza aviária foram detectados entre 1976 e 1997, todos causados por vírus do subtipo H7 (SIMS; TURNER, 2008), sendo dois H7N7 (1976 e 1985), dois H7N3 (1992 e 1995) e um H7N4 (1997). Os detalhes de cada um destes episódios foram relatados por Selleck et al. (2003) e Westbury (2003). Novos casos de influenza aviária não foram detectados na Austrália desde 1997, o que parece estar relacionado com a implementação de medidas de biossegurança nos plantéis comerciais ou, possivelmente, à reduzida população de aves selvagens devido às secas prolongadas (SIMS; TURNER, 2008).

O isolamento de um vírus HPAI a partir de um ganso na Província de Guangdong na China em 1996 foi um marco na história da influenza aviária. O vírus H5N1 detectado naquela ocasião disseminou-se por três continentes e infectou múltiplas espécies, de aves domésticas a mamíferos, incluindo seres humanos. A epidemia multicontinental envolvendo linhagens asiáticas de H5N1 perdurou por 11 anos e, apesar de medidas de erradicação terem sido tomadas em alguns países, as perspectivas de erradicação global são baixas (SIMS; BROWN, 2008), uma vez que o vírus se tornou endêmico nos plantéis de Bangladesh, China, Índia, Indonésia, Vietnã e Egito (ALEXANDER; BROWN, 2009).

Também no continente asiático, em fevereiro de 2013, foi detectado o envolvimento de um novo vírus H7N9 em casos humanos de influenza. A detecção de humanos infectados em Xangai e na província de Anhui, China, levou pesquisadores asiáticos a investigarem a possível origem desta infecção em mercados de aves vivas (SHI et al., 2013). O vírus H7N9 foi detectado nas amostras obtidas a partir de aves comercializadas nestes mercados e em amostras ambientais e os dados epidemiológicos sugerem que o contato com as aves infectadas ou com o ambiente dos mercados foi a fonte comum de muitos dos casos humanos, o que levou o governo chinês a fechar este tipo de estabelecimento em muitas províncias. No entanto, uma nova onda de H7N9 surgiu no outono chinês de 2013 (WATANABE et al., 2014).

Nos últimos dois anos, os Estados Unidos se viram acometidos por inúmeros surtos de influenza aviária causados por vírus dos subtipos H5N2, H5N8 e H5N1. Na página web do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA – *United States Department of Agriculture*), encontram-se disponíveis vários documentos sobre os casos detectados no país e a menção de que este surto foi a maior emergência sanitária animal da história do país. Desde meados de dezembro de 2014, vários casos de HPAI foram registrados nas rotas migratórias do Pacífico, Central e do Mississipi. Casos envolvendo aves selvagens de vida livre ou de cativeiro, aves de subsistência e aves comerciais foram relatados em vários estados norte-americanos, tendo o surto se originado com a detecção de H5N2 em perus (USDA, 2015).

Em meados de janeiro de 2016, os Estados Unidos voltaram a enfrentar problemas com a influenza aviária. Dessa vez, um surto combinado de HPAI e LPAI por um vírus H7N8 foi relatado no estado de Indiana, em uma granja comercial de perus. O caso índice foi confirmado como H7N8 de alta patogenicidade, mas oito detecções subsequentes a partir da zona de controle revelaram a presença de um H7N8 de baixa patogenicidade com alta similaridade com o vírus de alta. Devido à similaridade do vírus HPAI H7N8 com outros vírus norte-americanos detectados em aves selvagens, os relatórios do USDA sugerem que tenha havido recombinação de um vírus originário de aves selvagens antes de sua introdução no plantel de aves domésticas, mas que a mutação à forma patogênica identificada em apenas uma granja deve ter ocorrido durante a replicação do vírus nas aves domésticas (USDA, 2016).

No América do Sul, a primeira ocorrência de influenza aviária de alta patogenicidade foi relatada no Chile em 2002 (MAX et al., 2006). O surto foi causado por um vírus H7N3 que teria emergido de um vírus de baixa patogenicidade. A primeira detecção ocorreu numa granja de matrizes numa zona avícola altamente povoada, sendo seguida de nova detecção, uma semana depois, em uma granja de perus da mesma empresa localizada a 4 Km do caso índice.

Apesar da HPAI não estar presente na América do Sul, a presença de vírus de baixa patogenicidade ou de anticorpos para influenza A já foram detectados na região.

Em 1971, Anraku et al. relataram a presença de anticorpos tipo-específicos para influenza A em aves silvestres brasileiras a partir da técnica de imunodifusão. Os autores encontraram anticorpos para influenza A em 33 de 1332 amostras de soro, e concluíram que as aves silvestres brasileiras eram um reservatório para o vírus. Um novo estudo foi divulgado por Anraku et al. em 1976. Dessa vez, os autores verificaram a existência de anticorpos tipo-específicos para o vírus influenza A em amostras de soro de galinhas oriundas de diversas procedências. Foram utilizadas as provas de imunodifusão e inibição da hemaglutinação. Dos 110 soros analisados 24 foram positivos, resultando numa prevalência de 21,8%. Com base nos resultados encontrados, os autores indicaram que as galinhas poderiam ser consideradas como potenciais reservatórios do vírus influenza tipo A.

Em 2001, Oliveira Jr et al. divulgaram os resultados de uma avaliação soro-epidemiológica do vírus influenza em aves domésticas e silvestres do Rio de Janeiro. Neste trabalho, os autores empregaram a técnica de inibição da hemaglutinação com antígenos H1N1 e H3N2 para a pesquisa de anticorpos para influenza a partir de amostras de plasma de aves da Fundação RIO-ZOO e do Bwana Park no município do Rio de Janeiro e de pequenas propriedades nos municípios de Seropédica, Japeri e Paulo de Frontin. De um total de 225 aves testadas, 22 foram soropositivas para o H1N1, 28 soropositivas para o H3N2 e 10 para os dois subtipos. Entre as 123 aves silvestres, cinco foram positivas para o H1N1, 13 para o H3N2 e quatro para os dois subtipos. Das 102 aves domésticas, 17 foram positivas para o H1N1, 15 para o H3N2 e seis para os dois subtipos.

A presença de vírus influenza A em aves migratórias no Brasil também foi investigada por Kawamoto et al. (2005). Os autores capturaram aves silvestres, residentes e migratórias, em localidades do estado de São Paulo como Guarulhos (Parque Ecológico do Tietê), Juquitiba e Iguape. Especial atenção foi dada às espécies *Vireo olivaceus* (juruviara) e *Elaenia mesoleuca* (tuque) em virtude de suas características migratórias, uma vez que ambas migram entre os hemisférios Norte e Sul. Das 37 aves estudadas, 10 apresentaram resultados positivos ao isolamento viral, sendo a maioria dos isolados (71,4%) obtidos de suabes cloacais. Com base nos resultados obtidos, os autores concluem que estas duas espécies carregam o vírus influenza enquanto cruzam os hemisférios Norte e Sul.

Em 2014, de Araújo et al. relataram a detecção de um vírus influenza H11N9 em uma ave migratória da espécie *Arenaria interpres* (rola-do-mar ou vira-pedras) capturada na região Amazônica. O vírus detectado demonstrou alta similaridade com os genes HA e NA dos vírus da linhagem norte-americana encontrados em aves costeiras. Os resultados encontrados confirmam a presença de vírus influenza A de baixa patogenicidade em aves migratórias durante o período de chegada dos mesmos ao Brasil e alertam as autoridades para a importância de uma vigilância efetiva em aves migratórias devido ao seu impacto sobre a saúde humana e animal.

Outros países da América do Sul também já relataram o isolamento ou detecção molecular de diferentes subtipos do vírus de influenza aviária de baixa patogenicidade, como a Argentina (PEREDA et al., 2008; ALVAREZ et al., 2010; RIMONDI et al., 2011), a Bolívia (SPACKMAN et al., 2006), o Chile (MATHIEU et al., 2015) e o Peru (GHERSI et al., 2009; WILLIAMS et al., 2012; NELSON et al., 2016).

2.1.7 Manifestação clínica

Em aves domésticas os vírus da influenza aviária podem ser agrupados em dois patotipos de acordo com os sinais clínicos que podem causar, principalmente, em galináceos: baixa patogenicidade (*Low Pathogenic Avian Influenza - LPAI*) e alta patogenicidade (*Highly Pathogenic Avian Influenza - HPAI*). Até o presente momento, apenas os subtipos H5 e H7 foram responsáveis por HPAI em espécies susceptíveis, mas nem todos os vírus H5 e H7 podem ser classificados como HPAI (CATTOLI; MOONE, 2010).

Após a exposição a um vírus de influenza aviária, existem quatro possibilidades: não infecção, infecção assintomática (subclínica), doença branda e doença severa levando à morte. Considerando algumas cepas do vírus da influenza aviária e alguns hospedeiros, a exposição ao vírus pode não resultar em infecção, especialmente se a via de exposição for inapropriada, se a dose viral for abaixo do limiar necessário para iniciar uma infecção, se houver resposta imune prévia ao

agente ou se a cepa viral não for adaptada a uma espécie específica (PANTIN-JACKWOOD; SWAYNE, 2009).

Os vírus de influenza aviária de alta patogenicidade (HPAIV – *Highly Pathogenic Avian Influenza Virus*) e de baixa patogenicidade (LPAIV – *Low Pathogenic Avian Influenza Virus*) já foram detectados em várias aves domésticas, incluindo galináceos, aves de caça, patos, gansos, ratitas, pombos e aves de gaiola. No entanto, algumas espécies parecem ser mais resistentes à infecção e/ou doença do que outras (CFSPH, 2015).

As manifestações clínicas da influenza aviária dependem da espécie, idade e tipo de ave, das características específicas da cepa viral envolvida e de fatores ambientais. Em aves susceptíveis, a enfermidade pode variar de morte súbita sem sinais clínicos evidentes a uma forma mais característica da doença com manifestações clínicas que incluem sinais respiratórios como descarga nasal e ocular, tosse e dispneia, edema dos sinus e/ou da cabeça, apatia, vocalização reduzida, acentuada redução no consumo de água e comida, cianose das áreas de pele sem penas, barbela e crista, incoordenação e sinais nervosos e diarreia. Em aves de postura, queda na produção de ovos, normalmente acompanhada por um aumento no número de ovos com baixa qualidade, pode ser adicionalmente observada (OIE, 2015). Em algumas espécies, como é o caso dos patos de Pequim, alguns vírus de alta patogenicidade não provocam, necessariamente, enfermidade clínica significativa.

Os vírus de influenza aviária de alta patogenicidade produzem altas taxas de mortalidade em galinhas e, usualmente, em outros galináceos, mas o tempo transcorrido até a morte é tipicamente menor em galinhas e varia com a cepa viral. Os sinais clínicos variam com a duração da infecção, com os sistemas orgânicos ou órgãos afetados e com o grau de dano tecidual. Em um lote, as aves podem mostrar atividade reduzida, pouca produção de ruído e decréscimo no consumo de água e comida antes que o aumento de mortalidade seja detectado. Em aves de postura, a produção de ovos pode reduzir precipitadamente, cessando em seis dias. A forma peraguda da enfermidade é mais frequente em galinhas e perus do que nas demais espécies de galináceos, mas os sinais clínicos e a duração da enfermidade são similares. Se o curso da doença for agudo ou subagudo (3 a 10 dias), as aves

podem desenvolver sinais nervosos, incluindo tremores da cabeça e pescoço, torcicolo, opistótomos, nistagmo, posição incomum da cabeça, asas e pernas, batimento de asas, paresia, paralisia, excitação, convulsões, incoordenação, etc (PANTIN-JACKWOOD; SWAYNE, 2009).

Além disso, infecções por vírus influenza A de baixa patogenicidade, que normalmente não causam doença ou originam apenas sinais clínicos brandos, podem, em certas circunstâncias, produzir uma gama de sinais clínicos, cuja severidade se aproxima da influenza aviária de alta patogenicidade, particularmente se infecções exacerbantes e/ou condições ambientais adversas estiverem presentes (OIE, 2015).

2.1.8 Diagnóstico laboratorial

O diagnóstico laboratorial da influenza aviária baseia-se em métodos diretos (detecção do agente ou de seus constituintes) e métodos indiretos (detecção de resposta imune contra o agente).

A OIE recomenda as provas laboratoriais a serem empregadas para o diagnóstico de influenza A em aves de acordo com o propósito a que se destinam, ou seja, vigilância ativa, vigilância passiva, erradicação, trânsito de animais ou monitoramento de estado vacinal. O Quadro 1 apresenta os métodos disponíveis para o diagnóstico laboratorial da influenza aviária e o propósito de cada um deles, de acordo com o recomendado pela OIE (2015).

A validação é um processo que determina a aptidão de um ensaio que tenha sido adequadamente desenvolvido, otimizado e padronizado para o fim a que se destina. Todos os testes de diagnóstico, sejam para uso laboratorial ou a campo, devem ser validados para as espécies nos quais serão utilizados. A OIE possui recomendações específicas para a validação de testes de diagnóstico e certifica *kits* para diferentes enfermidades animais após avaliação do dossiê de validação. Os laboratórios de referência da OIE (laboratórios designados para tratar de todos os problemas científicos e técnicos relacionados a uma determinada enfermidade ou

agente) devem estar intimamente envolvidos com procedimentos de validação, inclusive estabelecendo painéis de soros ou amostras de referência que possam ser utilizados em processos de validação (OIE, 2013).

Quadro 1 - Métodos disponíveis para o diagnóstico laboratorial da influenza aviária de acordo com o propósito

Método	Propósito					
	População livre da infecção	Indivíduo livre da infecção antes do trânsito	Contribuição a políticas de erradicação	Confirmação de casos clínicos	Prevalência da infecção (vigilância)	Estado imune pós-vacinação em indivíduos ou populações
Métodos diretos¹						
Isolamento viral	+	+++	+	+++	+	-
Captura de antígeno	+	+	+	+	+	-
PCR em tempo real	++	+++	++	+++	++	-
Métodos indiretos²						
AGID	+ (Influenza A)	+ (Influenza A)	++ (Influenza A)	+ (convalescente)	++ (Influenza A)	++ (Influenza A)
HI	+++ (H5 ou H7)	++ (H5 ou H7)	+++ (H5 ou H7)	++ (convalescente)	+++ (H5 ou H7)	+++ (H5 ou H7)
ELISA	+	+	++	+ (convalescente)	++	++

Fonte: OIE (2015), adaptação de Reischak (2016)

¹ Se recomenda a aplicação combinada de diferentes métodos diretos na mesma amostra clínica.

² Um dos testes listados é suficiente.

Legenda: +++ = método recomendado; ++ = método adequado; + = método pode ser empregado em algumas situações, mas o custo, a confiabilidade ou outros fatores limitam seriamente a sua aplicação; - = não apropriado para esta finalidade; AGID = ágar-gel imunodifusão; HI = inibição da hemaglutinação; ELISA = ensaio imunoenzimático.

Nota: apesar de nem todos os testes classificados com +++ ou ++ terem sido formalmente validados, seu uso na rotina e o fato de serem amplamente empregados sem resultados duvidosos, os torna aceitáveis.

2.1.8.1 Métodos diretos

2.1.8.1.1 *Isolamento e identificação viral*

A demonstração da presença de vírus infeccioso por inoculação de material suspeito em ovos embrionados é o padrão ouro para o diagnóstico laboratorial da influenza aviária e, tradicionalmente, é realizado de acordo com métodos reconhecidos internacionalmente (CHARLTON; CROSSLEY; HIETALA, 2009; OIE, 2015).

A amostra suspeita é inoculada no saco corioalantóide de três a cinco ovos embrionados, preferencialmente oriundos de galinhas SPF (*Specific Pathogen Free*), com 9 a 11 dias de incubação. Os ovos inoculados são incubados e observados diariamente por 2 a 7 dias. Todos os ovos contendo embriões mortos ou moribundos, assim como todos aqueles que permaneceram vivos até o final do período de incubação, são refrigerados e tem seu líquido alantoide colhido para realização de uma prova de triagem para detecção de antígeno como, por exemplo, a hemaglutinação (HA). A detecção de atividade hemaglutinante em um líquido alantoide livre de contaminação bacteriana, indica uma alta probabilidade da presença de um vírus influenza A ou de um paramixovírus aviário. Caso o líquido alantoide da primeira passagem em ovos embrionados resulte negativo, recomenda-se que, pelo menos, mais uma passagem seja realizada (OIE, 2015).

A prova de HA é um teste clássico utilizado para triagem de sobrenadantes de cultivos celulares ou de líquido alantoide de ovos embrionados inoculados com amostras suspeitas de influenza. No entanto, não é um ensaio de identificação. O teste de HA deve ser seguido de uma prova de inibição da hemaglutinação (HI) para que sejam identificados os tipos e/ou subtipos virais (KILLIAN, 2014). Alternativamente, outros métodos podem ser utilizados para esta etapa inicial de triagem a partir do líquido alantoide, como o ágar-gel imunodifusão (AGID), o ELISA de captura de antígeno ou técnicas moleculares, como RT-PCR e PCR em tempo real (OIE, 2015).

A subtipificação antigênica do vírus isolado por HI pode ser realizada com soros de referência ou anticorpos monoclonais dirigidos para cada um dos 16 subtipos de hemaglutinina. Similarmente, os nove diferentes subtipos de neuraminidase também podem ser diferenciados por meio da técnica de inibição da neuraminidase (NI) (CHARLTON; CROSSLEY; HIETALA, 2009; PEDERSEN, 2014). A subtipificação também pode ser realizada por genotipagem utilizando *primers* específicos para os diferentes subtipos de H e N por RT-PCR ou PCR em tempo real; ou fazendo-se uso da análise das sequências dos genes HA e NA (OIE, 2015).

Após o isolamento e identificação de um vírus influenza A, faz-se necessária a determinação da patogenicidade viral. Tipicamente, a subtipificação e determinação da patogenicidade viral de isolados do AIV tem sido atribuição de laboratórios de referência nacionais ou laboratórios de pesquisa que contam com os reagentes específicos e com instalações para inoculação de animais. No entanto, com a enorme disponibilidade atual de técnicas moleculares, os isolados do AIV vêm sendo caracterizados e patotipificados por PCR, PCR em tempo real e sequenciamento genético dirigidos para os genes M, NP, HA e NA (CHARLTON; CROSSLEY; HIETALA, 2009).

A OIE (2015) adota critérios para a determinação de patogenicidade dos vírus influenza A. Um vírus influenza A é considerado de alta patogenicidade quando atende a um dos critérios abaixo:

- a) Qualquer vírus influenza A que seja letal para 75% de oito aves susceptíveis, com idade entre 4 e 8 semanas, num período de até 10 dias após a inoculação com 0,2 ml de uma diluição 1:10 de líquido alantoide infectivo livre de contaminação bacteriana; ou
- b) Qualquer vírus influenza A que tenha um índice de patogenicidade intravenosa (IVPI) ≥ 1.2 ;
- c) Para todos os vírus H5 e H7 de baixa patogenicidade em galinhas, a sequência de aminoácidos do peptídeo de conexão da hemaglutinina deve ser determinada. Se a sequência foi similar àquela observada em outros isolados de alta patogenicidade, o vírus será considerado de alta patogenicidade.

A determinação do sítio de clivagem por sequenciamento ou outras técnicas tem se tornado o método de escolha para a determinação inicial de patogenicidade dos vírus influenza A. Isso tem reduzido o número de testes *in vivo*, apesar da inoculação de animais ser ainda necessária para confirmar resultados negativos, uma vez que não se pode descartar a possibilidade de que existam populações virais contendo misturas de vírus de alta e baixa patogenicidade (OIE, 2015).

2.1.8.1.2 *Ensaaios imunoenzimáticos de captura de antígeno*

Vários *kits* de captura de antígeno estão disponíveis comercialmente para detecção de AIV em aves domésticas. Muitos destes *kits* são ensaios imunoenzimático imunoabsorvidos ou baseados em imunocromatografia e utilizam anticorpos monoclonais para a nucleoproteína, sendo capazes de detectar qualquer vírus influenza A (OIE, 2015).

A principal vantagem destes testes reside no tempo de execução, uma vez que um resultado positivo pode ser obtido em 15 minutos (OIE, 2015). No entanto, estudos realizados por diferentes autores demonstram que os resultados obtidos com estes *kits* devem ser avaliados com cautela, pois os mesmos apresentam baixa sensibilidade, podem não ter sido validados em diferentes espécies de aves e para diferentes tipos de amostras e não diferenciam subtipos virais, além de terem um custo elevado (RYAN-POIRIER et al., 1992; WOOLCOCK; CARDONA, 2005; CHUA et al., 2007).

Cinco *kits* comerciais de captura de antígeno para a detecção de influenza A tiveram seu desempenho comparado em amostras clínicas de aves (WOOLCOCK; CARDONA, 2005). Nenhum dos kits, quando comparados ao isolamento viral, provou ser suficientemente sensível para detectar com segurança o AIV a partir de suabes orofaríngeos e cloacais colhidos de aves experimentalmente infectadas com um vírus H6N2. Além disso, em virtude de baixa sensibilidade, os autores desaconselham o uso destes produtos em programas de vigilância ou como testes de triagem, uma vez que podem dar origem a resultados falso-negativos.

Resultados similares foram relatados após avaliação de cinco *kits* de detecção de antígeno de influenza A com diversos tipos de amostras obtidas de aves naturalmente infectadas (CHUA et al., 2007). Os autores verificaram que a sensibilidade dos testes para suabes cloacais e traqueais de aves aquáticas e selvagens é menor do que a obtida para galinhas e que os testes não são apropriados para uso em programas de vigilância em aves saudáveis. No entanto, mencionam que estes *kits* podem ser ferramentas valiosas para testar a campo suabes cloacais e traqueais de aves doentes ou mortas, contribuindo para o alerta rápido das autoridades competentes em caso de resultados positivos.

2.1.8.1.3 *Detecção de ácido nucleico viral*

Métodos moleculares são comumente utilizados para o diagnóstico da influenza aviária, uma vez que são sensíveis, podem ser realizados com rapidez, tem alto rendimento e custo moderado. Métodos diferentes, incluindo PCR convencional e PCR em tempo real (qPCR), vem sendo descritos para o diagnóstico da influenza aviária em aves domésticas com grande variação de *primers*, sondas, enzimas, etc., mas poucos deles têm sido validados (SUAREZ; DAS; ELLIS, 2007).

A técnica de RT-PCR (reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa) a partir de amostras clínicas pode resultar na detecção rápida do vírus e até mesmo na identificação do subtipo viral, desde que os *primers* corretos sejam definidos. O uso regular desta metodologia para o diagnóstico do vírus influenza A a partir do ácido nucleico extraído diretamente de amostras clínicas é pequeno, principalmente porque envolve uma etapa inicial de amplificação biológica do material em ovos embrionados antes que o mesmo seja submetido à extração de RNA. No entanto, a técnica de RT-PCR convencional continua a ser utilizada, especialmente para gerar produtos que podem ser utilizados no sequenciamento genético de isolados do AIV (SUAREZ; DAS; ELLIS, 2007; HOFFMANN et al., 2009; OIE, 2015).

Atualmente, o método preferido para detecção molecular do AIV é o qPCR, uma modificação do RT-PCR convencional que permite que o resultado da amplificação seja acompanhado em tempo real. O qPCR fornece rapidez, sensibilidade e especificidade na detecção do AIV a partir de amostras clínicas, características importantes para o manejo de surtos de influenza aviária, quando um diagnóstico imediato e inequívoco pode ser crucial para a tomada de decisões por parte do Serviço Veterinário Oficial (SUAREZ; DAS; ELLIS, 2007; HOFFMANN et al., 2009). Além disso, alguns sistemas de qPCR são desenhados para a detecção simultânea de 96 ou até 384 amostras por corrida, o que, combinado com uma plataforma robótica de extração de ácidos nucleicos, permite o processamento de um número grande de amostras por dia, o que pode ser extremamente útil em programas de vigilância ou em episódios de surtos de influenza aviária (AGUERO et al., 2007).

Uma prova de qPCR em um único passo para o gene M e para os subtipos H5 e H7 do AIV foi desenvolvido e validado por Spackman et al. (2002). A sensibilidade e especificidade dos ensaios foram comparadas com aquelas dos testes tradicionalmente utilizados para a detecção do AIV, como isolamento viral e HI. Os autores realizaram esta comparação em 1550 amostras de suabes cloacais e traqueais obtidos de aves de diferentes espécies oriundas de mercados de aves vivas de Nova Iorque e Nova Jersey, além de suabes ambientais. Os resultados encontrados demonstraram que os ensaios de qPCR desenvolvidos apresentaram uma boa correlação com as provas-ouro, além de terem menor custo e execução mais rápida, podendo ser utilizados como testes de triagem.

Um ensaio de qPCR para detecção simultânea dos subtipos H5, H7 e H9 do AIV a partir de amostras clínicas de aves foi desenvolvido e validado por Monne et al. (2008). Os resultados obtidos, assim como no trabalho anterior, também foram comparados ao isolamento viral e indicaram boa concordância entre os dois métodos, indicando que o ensaio multiplex pode ser rotineiramente utilizado no laboratório para a rápida detecção e diferenciação destes três importantes subtipos do AIV a partir de amostras de origem avícola.

Apesar de ensaios de qPCR serem amplamente utilizados para fins de vigilância por sua rapidez, sensibilidade e possibilidade de automação do processo,

a frequente emergência de novas linhagens do AIV requer que cada grupo de *primers* e sondas seja validado para um diverso grupo de vírus, a fim de que os ensaios sejam aplicáveis para várias espécies de aves, para diferentes áreas geográficas e distintos períodos de tempo (SLOMKA et al., 2007; SPACKMAN et al., 2008; OIE, 2015).

Outro fator a ser considerado quando da utilização de ensaios moleculares para a detecção do AIV é a possibilidade de obtenção de resultados falso-negativos, uma vez que o desempenho dos métodos pode ser afetado pela presença de inibidores da reação, por baixos títulos de vírus, por baixa qualidade do RNA extraído, por utilização de *primers* incompatíveis, por degradação do RNA antes da amplificação, por erros na execução da reação ou pelo emprego de reagentes degradados (SUAREZ; DAS; ELLIS, 2007; VAN BORM et al., 2007; EL ZOWALATY et al., 2011).

2.1.8.2 Métodos indiretos

2.1.8.2.1 Ensaio enzimático imunoabsorvido (ELISA)

Diferentes *kits* de ELISA, de formato indireto ou competitivo/bloqueio, têm sido desenvolvidos e validados para detectar anticorpos específicos para influenza A em aves. Independente do formato, a maioria dos *kits* comerciais disponíveis no mercado, detectam anticorpos para a nucleoproteína.

Os *kits* indiretos empregam conjugados espécie-específicos para galinhas e perus e são amplamente comercializados e utilizados. Já nos *kits* competitivos ou de bloqueio, anticorpos presentes na amostra de soro competem por sítios de ligação antigênica com anticorpos monoclonais dirigidos para um epítipo da nucleoproteína, proteína esta que é conservada em todos os vírus influenza A. A grande vantagem dos ensaios competitivos é a possibilidade de testar amostras de soros de múltiplas espécies, incluindo aves aquáticas e mamíferos (SHAFER; KATZ; EERNISSE, 1998; ZHOU et al., 1998; CHARLTON; CROSSLEY; HIETALA, 2009; OIE, 2015).

Relatos da utilização de formatos indiretos de ELISA para detecção de anticorpos específicos para influenza A em amostras de origem humana foram feitos por diversos autores nos anos 70-80 (LEINIKKI; PÄSSILÄ, 1976; DELIA et al., 1977; BISHAI; GALLI, 1978; LAMBRE; KASTURI, 1979; HAMMOND; SMITH; NOBLE, 1980). Naquela ocasião, os autores já mencionavam o ELISA como uma ferramenta promissora para o diagnóstico sorológico da influenza A uma vez que a sensibilidade do teste era superior àquela dos testes empregados na época, como HI e fixação de complemento, além de permitir a detecção precoce de anticorpos e o processamento de amostras de soro em larga-escala sem necessidade de tratamento prévio.

Na década de 80 foram publicados trabalhos sobre a utilização do ELISA indireto também para pesquisa de anticorpos para influenza A em amostras de origem aviária (SNYDER et al, 1985; ADAIR et al., 1989). De acordo com os resultados encontrados, os autores concluíram que o ELISA poderia ser uma boa alternativa diagnóstica, podendo ser empregado como teste de triagem em programas de erradicação e vigilância, com a vantagem de permitir o processamento de um grande número de amostras em poucas horas.

Apesar de amplamente utilizados, os testes de ELISA indiretos apresentam a desvantagem de serem espécie-específicos, o que limita o uso dos *kits* comercialmente disponíveis à pesquisa de anticorpos em galinhas e perus. Os primeiros relatos de utilização de ensaios de ELISA em formato competitivo ou de bloqueio para a detecção de anticorpos para influenza A a partir de amostras de múltiplas espécies remontam aos anos 90 (DE BOER; BACK; OSTERHAUS, 1990; SHAFER; KATZ; EERNISSE, 1998; ZHOU et al., 1998).

O desempenho de *kits* competitivos de ELISA (cELISA para detecção de anticorpos para influenza A em programas de vigilância em aves foi relatado por dois grupos de pesquisadores em 2010. Marché e Van Den Berg (2010) avaliaram na Bélgica duas estratégias de teste, uma utilizando *kits* competitivos para testar amostras de galináceos e não galináceos e outra empregando *kits* indiretos para testar apenas amostras de galináceos. Em ambas as estratégias, o teste de HI para os subtipos H5 e H7 foi utilizado como ensaio confirmatório. Os autores concluíram que para a realidade local, a melhor estratégia foi a primeira, uma vez que resultou

na menor quantidade de amostras de soro a serem confirmadas por HI. Além disso, ressaltaram que a escolha do tipo de ELISA a ser empregado por cada país em seus programas de vigilância dependerá do número de populações de não galiformes que precisam ser testadas e da prevalência da infecção nesta população.

Já Pérez-Ramírez et al. (2010) avaliaram o desempenho de dois *kits* de cELISA para vigilância em aves selvagens. Foram testadas 184 amostras de soro de aves de 23 diferentes espécies e pertencentes a 10 ordens. Verificou-se que ambos os *kits* detectaram amostras positivas para influenza A que haviam sido negativas no teste de HI para nove dos 16 subtipos, sugerindo que o cELISA possua uma sensibilidade maior do que o HI para estas espécies. No entanto, alertam para o fato de que os resultados podem variar de acordo com o tipo de ave, sendo interessante a realização de validações específicas para espécies e famílias de aves, como sugere a OIE.

2.1.8.2.2 *Ágar-gel imunodifusão*

A utilização do teste de ágar-gel imunodifusão (AGID) para pesquisa de anticorpos para as proteína RNP do influenza A em amostras de soro de mamíferos e aves foi relatada primeiramente por Beard (1970). O AGID tem sido ampla e rotineiramente empregado para detectar anticorpos específicos para influenza A em populações de galinhas e perus como um indicativo de infecção, mas é menos confiável para pesquisa de anticorpos em outras espécies de aves, pois nem todas produzem anticorpos precipitantes (OIE, 2015).

De maneira simples, o teste se baseia na difusão passiva de antígenos e anticorpos solúveis em uma matriz de gel, um em direção ao outro, levando à formação de imunocomplexos que se tornam visíveis sob a forma de linhas de precipitação (OUCHTERLONY, 1949).

O antígeno empregado na prova de AGID contém as proteínas M e NP do IAV (OIE, 2015). Sendo assim, a aplicabilidade deste ensaio se justifica por não ser espécie-específico e por detectar uma resposta imunológica para o vírus influenza A

independente do subtipo viral envolvido na infecção. Apesar de ser relativamente simples de realizar, este ensaio não se mostra tão sensível como outros disponíveis. Além disso, o AGID não pode ser utilizado em programas de vigilância sorológica em aves selvagens, uma vez que algumas espécies aquáticas nem sempre produzem anticorpos precipitantes, resultando em uma pobre sensibilidade diagnóstica (SNYDER et al., 1985; BROWN et al., 2010).

A despeito de possuir moderada sensibilidade, o teste de AGID pode detectar anticorpos mais precocemente do que outros ensaios, uma vez que detecta imunoglobulina M ao invés de imunoglobulina G. Adicionalmente, pode ser realizado a partir de amostras de soro, plasma e gema de várias espécies e dispensa o uso de equipamentos e consumíveis onerosos para sua realização. No entanto, o preparo de reagentes de boa qualidade requer investimento e tempo, o que faz com que muitos laboratórios utilizem antígenos e soros-controle produzidos por laboratórios de referência (SPACKMAN; SUAREZ; SENNE, 2008).

2.1.8.2.3 *Inibição da hemaglutinação*

A prova de inibição da hemaglutinação (HI) é considerada o padrão ouro para subtipificação de anticorpos para influenza A em amostras de soro, plasma ou gema. A técnica baseia-se no princípio de que anticorpos dirigidos para uma determinada HA são capazes de inibir a ligação do vírus homólogo às hemácias; sendo assim, o fenômeno de hemaglutinação é inibido quando anticorpos estão presentes. Para sua realização, é utilizado um painel contendo antígenos e antissoros representativos dos dezesseis diferentes subtipos de HA identificados até o momento (HIRST, 1942; SPACKMAN; SUAREZ; SENNE, 2008; COMIN et al., 2013). Este painel, tipicamente, é fornecido por laboratórios de referência da OIE, uma vez que a produção e otimização destes reagentes requer a existência de uma coleção de vírus representativa de todos os subtipos de hemaglutinina, além de uma estrutura laboratorial com segurança biológica para preparar os antígenos e inocular animais (LEE; SENNE; SUAREZ, 2006; PEDERSEN, 2014).

O teste de HI pode ser utilizado como um teste de triagem devido a sua alta sensibilidade, principalmente em áreas onde sabe-se que um subtipo específico está envolvido nos casos e onde se possui uma capacidade laboratorial instalada, incluindo aqui o fornecimento dos insumos. No entanto, a sensibilidade do ensaio pode ser reduzida quando um significativo *drift* antigênico ocorre em determinado subtipo viral, resultando em uma baixa reatividade entre os antígenos utilizados na prova e os anticorpos presentes nas amostras testadas (YAMAMOTO et al., 2007; SPACKMAN; SUAREZ; SENNE, 2008).

Apesar de ser um teste de execução simples, rápido e de fácil interpretação, a prova de HI é relativamente onerosa para ser utilizada como um ensaio de triagem em virtude da quantidade de antígenos e antissoros necessários para sua realização. Uma de suas maiores vantagens, no entanto, reside na possibilidade de uso de antígenos inativados, eliminando a necessidade de medidas especiais de biossegurança no laboratório (SPACKMAN; SUAREZ; SENNE, 2008).

Outro fator importante a ser considerado na execução da técnica é a possibilidade de inibição inespecífica da aglutinação por inibição estérica da neuraminidase. A fim de evitar este efeito, recomenda-se que o antígeno empregado na prova possua um subtipo diferente de NA daquele do soro a ser testado ou que os antígenos utilizados sejam isentos da fração N, podendo ser recombinantes ou purificados (OIE, 2015).

2.2 AVICULTURA DE SUBSISTÊNCIA E INFLUENZA AVIÁRIA

As propriedades de subsistência ou granjas familiares são, por definição, aquelas que mantêm um número reduzido de aves unicamente para obtenção de carne e ovos para consumo familiar, sendo observadas, geralmente, em comunidades rurais ou em zonas periurbanas de grandes cidades. Além de conter um pequeno número de aves, as criações de subsistência caracterizam-se por empregar mão-de-obra familiar, especialmente de mulheres e crianças, por

possuírem aves de múltiplas espécies e idades e por medidas pobres ou inexistentes de biossegurança (ALDERS, 2005; CONAN et al., 2012).

2.2.1 Importância socioeconômica

Mais de 90% das famílias rurais em muitos dos países em desenvolvimento mantem uma ou mais espécies de aves domésticas para consumo familiar. A avicultura de subsistência ou familiar é praticada por todos os grupos étnicos e constitui um importante componente da economia doméstica, contribuindo para a produção de alimentos e geração de renda em comunidades carentes. Além disso, a avicultura familiar está estreitamente associada aos hábitos religiosos e socioculturais de milhares de comunidades de baixa renda (GUËYE, 2005).

A produção de alimentos de origem animal em sistemas de fundo de quintal, ainda que não alcance o nível de produção dos sistemas comerciais, pode ser socioeconomicamente de maior importância pela quantidade de pessoas que se beneficiam dessa atividade. A “pecuária de fundo de quintal” não representa um grande ônus econômico para as famílias que a praticam, uma vez que as instalações são rústicas e a mão-de-obra é mínima, com grande participação de mulheres e crianças. O rendimento, medido pela produção de carne e ovos é, geralmente, baixo, mas a necessidade de investimento em insumos, manejo e alimentação suplementar das aves também é mínimo (ALDERS, 2005; GUTIÉRREZ-RUIZ et al., 2012).

A avicultura familiar ou de subsistência também possui um impacto positivo para o meio-ambiente, pois as aves, ao buscarem seu próprio alimento, contribuem para o controle de pragas e parasitas. Além disso, o esterco produzido é de grande utilidade para a fertilização das hortas e outros cultivos básicos das famílias (ALDERS, 2005).

Se por um lado, a avicultura familiar permite a melhoria da qualidade da dieta das famílias pelo incremento proteico, a fixação do homem à terra e o asseguramento de renda complementar ao orçamento, por outro lado, este tipo de

atividade necessita de uma maior área para implantação, possui uma produtividade inferior ao do sistema industrial e as aves estão mais expostas a agentes patogênicos (CRUZ; CHAGAS; BOTELHO, 2013).

2.2.2 Papel das aves de subsistência na epidemiologia da influenza aviária

As aves domésticas são um importante elo entre as aves selvagens e os seres humanos no aparecimento e perpetuação de estirpes virais que podem, potencialmente, infectar humanos (WEBSTER et al., 1992).

Vírus de influenza aviária de baixa patogenicidade oriundos de aves aquáticas de vida livre têm sido introduzidos em plantéis de galináceos e de aves aquáticas domésticas. Os galináceos (galinhas, perus, codornas e galinhas d'Angola) de diversos sistemas de produção agrícola podem se infectar pelo AIV desde que duas condições sejam atendidas: exposição e adaptação. A exposição pode ocorrer quando há criação ao ar livre, acesso ao meio externo nos sistemas semiconfinados, acesso de aves silvestres às instalações ou exposição ambiental, como o uso de águas superficiais contaminadas pelo vírus. A exposição resultará em infecção significativa apenas se o vírus for suficientemente adaptado ao hospedeiro. Esse AIV adaptado aos galináceos passa então a circular dentro dos sistemas de produção, sejam eles de subsistência ou comerciais (SWAYNE, 2007).

Aves domésticas aquáticas criadas de forma livre podem constituir uma importante fonte de transmissão da influenza A as demais espécies domésticas, principalmente se são criadas sob as mesmas condições de manejo e interação com espécies silvestres (KOCH; ELBERS, 2006). Os patos podem ser considerados verdadeiros “cavalos de Tróia” com relação aos vírus H5N1 asiático, uma vez que este vírus se torna menos patogênico para esta espécie mas permanece patogênico para outras aves domésticas e, potencialmente, para humanos; sendo assim, o papel dos patos na propagação destes vírus gera grande preocupação para a saúde humana e animal (HULSE-POST et al., 2005; KIM et al., 2009).

Tipicamente, as aves de subsistência circulam livremente pela vizinhança durante o dia, podendo ter acesso a ruas, campos, corpos de água e depósitos de lixo. À noite são recolhidas e mantidas em lugares mais protegidos, como galinheiros, gaiolas rudimentares ou até mesmo em aposentos domésticos. Esse tipo de manejo contribui para a introdução da influenza aviária na população avícola, predispondo ao desenvolvimento de subtipos de alta patogenicidade e aumentando a possibilidade de transmissão aos seres humanos (IQBAL, 2009; EL-ZOGHBY et al., 2011; SHETA et al., 2014).

Em Bangladesh, país asiático onde 90% da população pratica a avicultura familiar, verificou-se que o risco de infecção pelo AIV H5N1 pode aumentar neste tipo de criação devido a fatores ambientais, agroecológicos, físicos, sociais e culturais. Humanos e aves domésticas, especialmente patos, compartilham dos mesmos mananciais de água que as aves silvestres e migratórias, seja para banho, pesca ou lavagem de roupas. Além disso, 93% das 300 famílias visitadas relataram que durante a noite as aves são mantidas dentro de casa. Estas ações permitem que tanto humanos quanto aves sejam facilmente infectados uns pelos outros (KHAN et al., 2012).

O comércio e a troca de aves vivas, prática comum em algumas comunidades, podem contribuir para a perpetuação da infecção pelo AIV e disseminação a outras criações. Em mercados locais de aves vivas, por exemplo, animais de diferentes origens e espécies compartilham de um mesmo espaço. Aqueles não vendidos retornam as suas criações e os ali adquiridos são introduzidos nos plantéis sem que qualquer medida sanitária, como a quarentena, seja tomada (VAN DEN BERG, 2009; KHAN et al., 2012).

A importância das aves de subsistência na disseminação e/ou perpetuação da influenza aviária foi relatada por diversos grupos (WERNER; STARICK; GRUND, 2003; SEDYANINGSIH et al., 2007; BISWAS et al., 2009; EL-ZOGHBY et al., 2011; SULTANA et al., 2012; WANG et al., 2013). Por outro lado, alguns autores mencionam que criações de fundo de quintal teriam menor susceptibilidade à infecção pelo AIV do que os plantéis comerciais e que a contribuição deste tipo de população na epidemiologia da influenza aviária pode ser considerada de baixa a moderada (BAVINCK et al., 2009; SMITH; DUNIPACE, 2011).

2.2.3 Importância da interação das aves de subsistência com aves silvestres

O contato contínuo com aves silvestres, nativas ou migratórias, assim como a ausência de medidas de biossegurança, torna as criações de subsistência muito mais vulneráveis à infecção por AIV do que os plantéis comerciais (ALEXANDER, 2000; EL-ZOGHBY et al., 2011).

No norte da Itália, durante vigilância ativa realizada em aves de subsistência e em aves silvestres, principalmente migratórias, entre os anos de 2004 e 2006, verificou-se que a disponibilidade de comida nas criações de fundo de quintal atraía as aves silvestres, resultando na interação entre animais domésticos e selvagens e na deposição de excrementos, favorecendo a introdução da influenza aviária nestas populações. Observou-se também que o comércio ou trânsito de aves de subsistência ou de matéria orgânica contaminadas poderia levar à disseminação do vírus às criações comerciais (TERREGINO et al., 2007).

A primeira introdução do vírus HPAI H5N1 no Egito, em fevereiro de 2006, foi atribuída à interface aves migratórias-aves de subsistência. Atividades de vigilância na população de fundo de quintal foram mantidas a partir daí e em 2007 detectou-se a presença de anticorpos para o subtipo H5 em 4,3% (n = 207) das amostras de soro analisadas. A partir destes resultados, concluiu-se que se faz necessário o monitoramento contínuo destas criações, principalmente daquelas próximas a áreas alagadas, a fim de detectar precocemente a introdução de novos vírus, uma vez que as criações de fundo de quintal parecem desempenhar um papel central na perpetuação e circulação ambiental do AIV no país (ALY; ARAFA; HASSAN, 2008; EL-ZOGHBY et al., 2011).

A importância da interação entre aves domésticas de subsistência e aves silvestres como uma potencial rota de transmissão de influenza aviária também foi alvo de estudo em duas regiões rurais da Nova Zelândia onde o AIV havia sido previamente detectado em patos selvagens. Pequenos plantéis não comerciais de aves de subsistência foram amostrados e não foram detectados anticorpos específicos para H5 e H7 em qualquer uma das amostras positivas de galinhas

(11/309) ou de patos (16/54) no teste de ELISA. No entanto, o estudo confirmou que as pequenas criações de aves de fundo quintal localizadas próximas a habitats de aves silvestres aquáticas foram expostas a vírus não notificáveis de influenza aviária. Adicionalmente, os achados indicaram potenciais rotas de transmissão da AI entre aves selvagens e plantéis não comerciais e, portanto, a necessidade de uma vigilância continuada nestas populações (ZHENG et al., 2010).

A localização próxima a mananciais de água que servem de ponto de congregação de aves silvestres, aves aquáticas e pragas, assim como a falta de alojamentos adequados, foram fatores de risco importantes para a transmissão da influenza aviária a plantéis de aves de subsistência de três regiões de Maryland, EUA. Apesar do RNA do AIV não ter sido detectado nas criações amostradas, quase um quarto dos plantéis apresentou anticorpos para influenza A, indicando a exposição prévia das aves ao agente. Os autores salientam que medidas simples de biossegurança, como proteger as aves domésticas do contato com aves silvestres e a implantação de um plano de controle de pragas, auxiliariam na mitigação de riscos para a saúde humana e animal (MADSEN et al., 2013b).

2.3 AVES MIGRATÓRIAS E INFLUENZA AVIÁRIA

2.3.1 A migração

A migração em aves pode ser definida como um movimento regular e sazonal entre áreas de reprodução e de invernada geograficamente separadas. Dois tipos de migração são reconhecidos: a obrigatória e a facultativa. Na primeira, as aves parecem se encontrar pré-programadas para deixar suas áreas de reprodução em uma determinada época do ano e retornarem a ela algum tempo depois; o tempo, as direções e as distâncias são relativamente constantes ano a ano. Já a migração facultativa é considerada opcional; os indivíduos podem migrar em um ano

e não em outro, dependendo da oferta de alimento e das condições do tempo (NEWTON, 2011).

Mais de dois terços das aves terrestres que se reproduzem na América do Norte migram longas distâncias para áreas de não reprodução no México, América Central, América do Sul e ilhas do Caribe. Apesar de algumas aves serem capazes de fazerem voos sem paradas entre os pontos de origem e de destino, muitas aves migrantes alternam períodos de voo com períodos de descanso para alimentação e descanso (MOORE et al., 2005).

Das 1919 espécies de aves registradas no Brasil, nem todas se reproduzem no país. Há um número razoável de espécies que se reproduzem em outras partes do planeta e usam os ecossistemas brasileiros somente durante o período não reprodutivo. As aves mais conhecidas desse grupo são as espécies migrantes neárticas, que são as que se reproduzem na América do Norte e passam o período não reprodutivo na região Neotropical (CI-BRASIL, 2011; ICMCBIO, 2015).

Os habitats selecionados pelas aves migratórias ao longo de suas rotas são diversos e estão relacionados aos hábitos alimentares, disponibilidade de recursos e táticas de forrageamento das espécies envolvidas. Devido à distribuição descontinuada desses recursos, as aves migrantes geralmente se concentram em áreas específicas onde trocam as penas, alimentam-se e adquirem reservas energéticas para a continuação da viagem (ICMCBIO, 2015).

2.3.2 Rotas migratórias

A área geográfica total utilizada por uma população, espécie ou grupos de espécies durante seu ciclo anual é chamada de rota migratória. Sendo assim, a rota migratória compreende todos os sistemas ecológicos necessários para a sobrevivência e cumprimento do ciclo anual, incluindo áreas de reprodução e de não reprodução, os lugares de alimentação e descanso e a área dentro da qual as aves migram (BOERE; STROUD, 2006; KIRBY et al., 2008).

As rotas migratórias das aves não são caminhos específicos, mas sim rotas gerais que muitas aves migrantes tendem a seguir. Para orientação da migração as

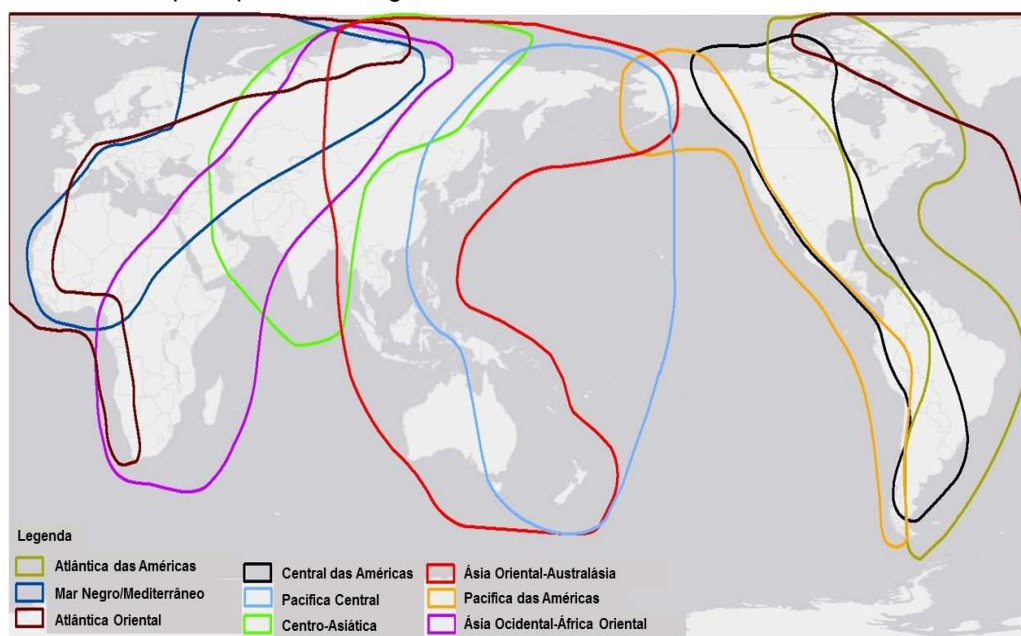
aves utilizam as estrelas, o sol, o campo magnético da Terra e até mesmo o olfato (WILTSCHKO; WILTSCHKO, 2003; GAGLIARDO, 2013).

De modo geral, as aves que migram a partir da costa leste do Canadá e dos Estados Unidos atravessam o Atlântico em voos ininterruptos, ou fazendo paradas em ilhas do Caribe, até a América do Sul. Já aquelas que migram pelo interior do Canadá e Estados Unidos atravessam a América Central pela costa Atlântica ou pela costa Pacífica (ICMCBIO, 2015).

Segundo o *The Wetlands International*, são reconhecidas nove principais rotas migratórias no mundo: Atlântica das Américas, Central das Américas, Pacífica das Américas, Atlântica Oriental, Centro-Asiática, Ásia Oriental-Australásia, Mar Negro-Mediterrâneo, Ásia Ocidental-África Oriental e Pacífica Central (Figura 2).

Nas Américas, especificamente, destacam-se quatro rotas migratórias: Pacífica, Central, Mississippi e Atlântica (NATIONAL AUDUBON SOCIETY, 2016). No Brasil (Figura 3), existem cinco rotas principais que são utilizadas, principalmente, pelas aves migratórias neárticas: Atlântica, Nordeste, Brasil Central, Amazônia Central/Pantanal e Amazônia Ocidental (ICMCBIO, 2015).

Figura 2 - As nove principais rotas migratórias do mundo



Fonte: <http://wpe.wetlands.org/lwhatfly> (2016), adaptação de Reischak (2016)

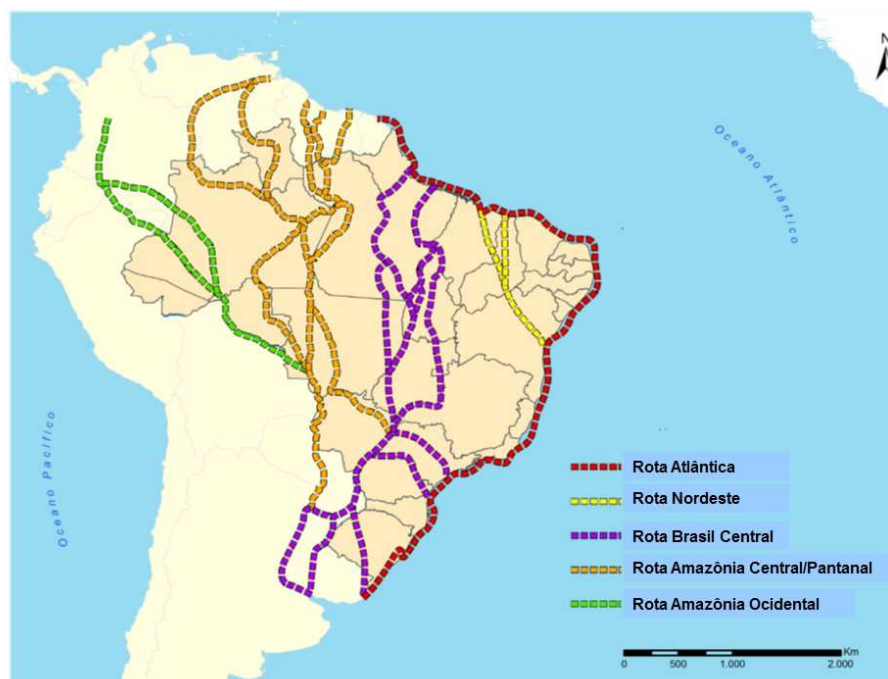
2.3.3 Papel das aves migratórias na epidemiologia da influenza aviária

As aves migratórias são reservatórios naturais do AIV, hospedam uma ampla diversidade de subtipos e constituem uma população dinâmica para a evolução viral e a transmissão a aves domésticas e mamíferos (MACHALABA et al., 2015).

A dispersão do AIV na natureza está intrinsecamente relacionada ao movimento das aves selvagens, uma vez que a migração pode facilitar a circulação do vírus entre as áreas de reprodução e não reprodução. Os sítios de não reprodução, por exemplo, podem atuar como verdadeiras “áreas de mistura” do AIV, pois possibilitam o contato intercontinental entre aves de diferentes origens, criando oportunidades de rearranjo viral (FOUCHIER; MUNSTER, 2009; HILL et al., 2012).

Apesar de não ter havido participação das aves selvagens no surto inicial de HPAI H5N1 nas aves domésticas da Ásia em 2003-2004, o padrão de dispersão da doença a outros países e a alta mortalidade observada em aves selvagens na China na primavera de 2005, sugere o possível envolvimento das aves aquáticas migratórias na transmissão da influenza aviária. No entanto, as atividades humanas de comércio legal e ilegal, particularmente aquelas associadas com aves domésticas, contribuíram significativamente para a dispersão global da enfermidade (GAUTHIER-CLERC; LEBARBENCHON; THOMAS, 2007; FAO, 2007).

Figura 3 - Principais rotas de aves migratórias Brasil



Fonte: ICMCBIO (2015), adaptação de Reischak (2016)

O papel das aves migratórias como responsáveis pela introdução de um novo vírus HPAI H5N2 em um plantel comercial de perus em British Columbia, Canadá, em 2014, foi discutido por Pasick et al. (2015). O fato dos surtos terem ocorrido em um período do ano em que a atividade migratória na região é intensa e considerando também o relato de detecção de um vírus HPAI H5N8 Euroasiático em um falcão nos Estados Unidos, sugere que o vírus tenha sido introduzido na América do Norte pelas aves migratórias e, posteriormente, sofrido rearranjo com vírus nativos.

Em um trabalho de predição do risco de disseminação global do H5N1 foram avaliados os dados de relações filogenéticas, movimento de aves migratórias e comércio de aves domésticas e selvagens de 52 eventos de introdução individual. Os autores concluíram que o movimento das aves migratórias foi a principal via de dispersão do vírus H5N1 na Europa, enquanto na Ásia e África houve participação tanto das aves migratórias como das domésticas (KILPATRICK et al., 2006).

2.4 VIGILÂNCIA ATIVA PARA INFLUENZA AVIÁRIA

Um sistema de vigilância constante e global é o meio mais eficaz de se identificar e controlar a influenza animal. Nos últimos anos, as atividades de vigilância ativa se intensificaram mundialmente com o intuito de detectar precocemente a infecção por vírus de influenza aviária de baixa patogenicidade (FOUCHIER; OSTERHAUS; BROWN, 2003). De acordo com Comin et al. (2012), a detecção precoce da infecção por LPAIV se tornou extremamente importante em virtude do potencial de mutação destes em vírus de influenza aviária de alta patogenicidade (HPAIV).

2.4.1 Vigilância em aves de subsistência

Na Itália, durante o período de 2004 a 2006, diferentes subtipos de AIV foram isolados a partir de amostras colhidas em propriedades onde se mantinham criações mistas de patos, galinhas, perus e galinhas d'Angola. As amostras foram triadas por PCR em tempo real e todas aquelas com resultado positivo foram submetidas à prova de isolamento viral em ovos embrionados SPF. Excluindo um vírus isolado a partir de galinha d'Angola, todos os demais isolados (26) foram obtidos a partir de anseriformes domésticos (TERREGINO et al., 2007), evidenciando mais uma vez o papel das aves aquáticas domésticas na perpetuação da LPAI na natureza (WEBSTER; HULSE, 2004).

Estudo similar foi realizado no Irã, a fim de avaliar a exposição de aves de subsistência ao vírus H9N2 que ocasionou um surto de LPAI na indústria avícola iraniana em 1998. A soroprevalência para H9N2 foi determinada em galinhas de fundo de quintal de aldeias localizadas na região do mar Cáspio (HADIPOUR, 2010) e do lago Maharlou (HADIPOUR; HABIBI; VOSOUGUI, 2011), regiões estas que recebem, anualmente, numerosas espécies de aves migratórias. A média de títulos encontrados ao teste de HI e a soroprevalência para H9N2 foram, respectivamente,

6.52 e 72,98% na região do mar Cáspio e 7.73 e 81,6% na região do lago Maharlou. De acordo com estes resultados, os autores concluíram que o subtipo em questão é endêmico nas aves de fundo de quintal do Irã e que isso ocorre devido ao contato estreito e frequente das aves de subsistência com numerosas e diferentes espécies de aves aquáticas migratórias.

Uma triagem baseada em amostras de sangue e em suabes de cloaca e de traqueia para estudar a prevalência da influenza A na população avícola de Grenada foi realizada em 2009 e 2010. Foram colhidas 230 amostras de sangue de aves de fundo de quintal, sendo 143 galinhas, 45 patos, 10 perus, 01 galinha-de-Angola e 31 pombos. As amostras foram submetidas ao teste de ELISA e 27 amostras de galinhas apresentaram anticorpos para o AIV (SABARINATH et al., 2011). No entanto, não houve detecção do AIV por PCR em tempo real ou isolamento viral a partir dos 230 “pools” de suabes de cloaca e de traqueia coletados.

Entre 2007 e 2009, monitorias ativas foram conduzidas em aves de fundo de quintal (galinhas, galinhas-de-Angola e patos) em quatro áreas de Côte d'Ivoire, incluindo duas áreas onde ocorreram surtos de H5N1 em 2006. No total, foram colhidas 5578 amostras de soro, 4580 suabes de traqueia e 5120 suabes de cloaca. Utilizando o teste de HI detectou-se 277 amostras de soro positivas para H5 e 36 amostras positivas para H7; todas as amostras foram negativas para H9. Não houve detecção de suabes positivos por RT-PCR. Os dados encontrados confirmaram a circulação dos subtipos H5 e H7 dentre a população de aves de fundo de quintal da região (COUACY-HYMANN et al., 2012a).

No Timor Leste (SERRÃO et al., 2012) um estudo também foi conduzido para determinar a prevalência de anticorpos para influenza aviária em galinhas de fundo de quintal. De um total de 1134 amostras de soro, apenas quatro foram positivas por ELISA competitivo. Estas quatro amostras foram posteriormente submetidas à prova de HI para pesquisa de anticorpos para os subtipos H5N1, H5N3, H7N3 e H9N2, mas todas resultaram negativas. Segundo os autores, os resultados sugerem que estas quatro aves foram expostas a vírus da AI de baixa patogenicidade de diferentes subtipos.

Em virtude da falta de informação sobre a circulação do AIV em aves de subsistência de Omã, no Oriente Médio, foi realizado um estudo de soro-vigilância e

fatores de risco nestas criações. Foram colhidas amostras de soros e de suabes em 243 criações do país, totalizando 2350 aves amostradas. Os resultados dos testes sorológicos demonstraram que 90% das criações de subsistência do país estão expostas ao AIV, podendo representar risco aos plantéis comerciais e às aves migratórias. Essa alta soroprevalência parece estar associada a fatores de risco tais como exposição a aves selvagens, introdução de novas aves nas criações, interação com criações vizinhas e alimentação com resíduos crus de aves (SHEKAILI et al., 2015)

Um programa de vigilância para influenza aviária em aves de subsistência foi também realizado na Argentina entre 1998 e 2005. Esta população foi escolhida em virtude da falta de medidas de biossegurança das criações e pelo fato de estar exposta a um possível contato com aves selvagens. Foram testadas mais de oito mil amostras de soro por ELISA e/ou AGID e mais de 18 mil suabes de traqueia e cloaca foram submetidos ao isolamento viral. Nenhum resultado positivo foi detectado durante todo o período estudado (BUSCAGLIA et al., 2007).

Um inquérito epidemiológico de doenças respiratórias, incluindo a influenza aviária, foi realizado em aves de subsistência do Parque Nacional da Lagoa do Peixe no Rio Grande do Sul por Marks (2014). No estudo, foram colhidas amostras de suabes e soro de 411 aves (das quais 389 eram galinhas) em 48 domicílios. Apenas seis aves foram positivas para influenza A por ELISA, mas nenhuma positividade foi encontrada no ensaio de PCR em tempo real a partir dos suabes. Os resultados encontrados, somados à ausência de relatos de surtos ou enfermidade nas aves e a uma modelagem de espalhamento da AI no RS, levaram a autora a concluir que há circulação de LPAI na região, podendo a mesma servir como porta de entrada para o AIV.

2.4.2 Vigilância em aves migratórias

Em condições naturais, as infecções pelo AIV em aves selvagens são tipicamente apatogênicas ou subclínicas (WEBSTER et al., 1992; VAN GILS et al.,

2007). Após a emergência do HPAI H5N1 na Ásia e a dispersão deste a outros países, programas de vigilância em aves selvagens migratórias foram implementados, ainda que de forma esporádica e geograficamente tendenciosa (MACHALABA et al., 2015).

Entre abril de 2006 e março de 2011, os Estados Unidos executaram um plano estratégico para detecção precoce de AIV em aves migratórias. Inicialmente motivado pelo envolvimento das aves migratórias nos surtos de HPAI H5N1 na Ásia (DELIBERTO et al., 2009), o sistema de vigilância foi reestruturado ao longo do tempo para a detecção do maior número de vírus de influenza A possível, independentemente de sua patogenicidade. Durante este período, foram coletadas pelo Departamento de Agricultura dos EUA, aproximadamente, 284 mil amostras nas quatro principais rotas migratórias das Américas (Atlântica, Pacífica, Central e Mississippi). Mais de 250 espécies de aves selvagens foram amostradas, mas 86% das amostras foram obtidas de patos, gansos, cisnes e aves limícolas. Foram isolados 513 vírus, sendo que de 413 deles foi possível obter a identificação exata. Os subtipos mais frequentes foram H3, H4, H5 e H7 e N2, N3 e N6 e os vírus mais encontrados foram, respectivamente, H5N2, H4N6 e H7N3 (PEDERSEN; SWAFFORD; DELIBERTO, 2010; BEVINS et al., 2014).

Após o relato de surtos de HPAI H5N2 em British Columbia, Canadá, em novembro de 2014, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos intensificou as atividades de vigilância para influenza aviária ao longo da fronteira do Canadá, especialmente em aves domésticas, aves selvagens caçadas e aves selvagens encontradas mortas. Em dezembro de 2014, uma alta mortalidade em aves aquáticas foi detectada no Lago Wiser, em Washington, em dezembro de 2014. Os suabes cloacais e traqueais de cinco aves foram positivos para o subtipo H5 do AIV, sendo que um vírus H5 clado 2.3.4.4 de linhagem Euroasiática foi isolado de uma amostra de pulmão. Dias mais tarde, um vírus similar foi isolado de um falcão-gerifalte (*Falco rusticolus*) de um cativeiro localizado a aproximadamente oito quilômetros do Lago Wiser. Este e outros falcões do cativeiro foram alimentados com uma ave aquática que havia sido capturada. A detecção deste vírus em aves selvagens sugere que estas possam contribuir para a disseminação desta linhagem de H5 na América do Norte (IP et al., 2015).

Vigilância anual para influenza aviária em aves selvagens também é conduzida na Coreia do Sul desde 2008. Dentre os subtipos detectados nas aves capturadas, o H5 foi o único isolado nos anos de 2010 e 2014, vindo de encontro com os surtos de HPAI H5N1 e H5N8 que ocorreram em plantéis de aves comerciais nestes mesmos anos e sugerindo o papel chave das aves selvagens na introdução e disseminação da HPAI no país (KIM et al., 2012; JEONG et al., 2014).

A primeira pesquisa oficial de influenza aviária em aves selvagens na Europa ocorreu em 2002 por adesão voluntária dos países membros. Entre 2003 e 2004 apenas onze países participaram do programa e foram encontradas nove amostras positivas para AIV (seis vírus H7, nenhum H5) em 2003 (n = 3829) e 214 positivas em 2004 (n = 8943), das quais 15 H5 e sete H7. Já em 2005 o número de aves amostradas foi seis vezes maior (n = 47.232), em virtude da adesão de todos os países; deste total, 1315 amostras foram positivas para AIV, sendo 156 para o subtipo H5 e nove para o subtipo H7. Em resposta aos surtos de HPAI H5N1 asiático em países membros, a vigilância ativa e passiva para influenza em aves selvagens tornou-se compulsória em 2006 e espécies migratórias das ordens Charadriiformes e Anseriformes, classificadas como de alto risco, foram o alvo da atividade. Foram testadas 120.706 aves e foram detectadas 591 positivos para HPAI H5N1 e 1615 aves positivas para LPAI, sendo 136 para LPAI H5 e 26 para LPAIV H7 (HESTERBERG et al., 2009).

A partir de 2006, o número de aves silvestres amostradas na Europa diminuiu consideravelmente até 2013. No final de 2014, no entanto, com a detecção do vírus HPAI H5N8 em granjas da Holanda, Alemanha e Reino Unido, as atividades de vigilância em aves migratórias voltaram a se intensificar. Na Holanda, 4018 aves de 25 espécies e pertencentes a cinco ordens foram amostradas no período de novembro de 2014 a fevereiro de 2015. Dentre as 334 aves positivas para AIV, 10 foram positivas para o subtipo H5, sendo que em apenas duas piadeiras (*Anas penelope*) foi detectado o vírus HPAI H5N8; os demais isolados tratavam-se de LPAI H5 (VERHAGEN et al., 2015).

Na América do Sul, os relatos de vigilância em aves selvagens migratórias são escassos. No Chile, um programa de vigilância focado na colheita periódica de aves silvestres suspeitas ou enfermas ao longo da costa foi implementado após o

surto de HPAI relatado em 2002. Durante os anos de 2007 a 2009, como parte das atividades de vigilância, foram relatados ao SAG (*Servicio Agrícola y Ganadero*) casos de aves mortas nas costas Central e Norte do país. Quatro animais infectados por AIV foram detectados por PCR em tempo real e três vírus LPAI (H5N9, H13N2 e H13N9) foram isolados de gaivotas-de-Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) e de um gaivotão (*Larus dominicanus*). A análise das sequências de nucleotídeos dos vírus isolados indicou uma alta similaridade com vírus anteriormente detectados em aves selvagens na América do Norte, sugerindo uma via de disseminação de IAV ao longo da costa das Américas (MATHIEU et al., 2015).

Vigilância em aves aquáticas migratórias e residentes também vem sendo realizada na Argentina desde 2006 como resultado de parcerias com organizações internacionais. Como fruto deste trabalho, as atividades de vigilância foram centradas em áreas localizadas ao longo de importantes rotas de aves migratórias (costa Atlântica e rios Paraná e Uruguai). No período de março de 2006 a dezembro de 2007, 2895 suabes cloacais foram colhidos de aves aquáticas mortas durante atividades de caça ou capturadas vivas, resultando em 12 amostras positivas para AIV por PCR em tempo real. Apenas um vírus H13N9 foi isolado e sequenciado (PEREDA et al., 2008). Entre janeiro de 2007 e julho de 2010, um total de 4504 suabes foram colhidos e testados, resultando em 38 amostras positivas para AIV por PCR em tempo real. O AIV foi isolado de apenas oito amostras positivas, sendo que seis dos vírus foram obtidos de marrecão (*Netta peposaca*), uma espécie que migra ao Rio Grande do Sul no inverno e retorna à Argentina no verão. Os vírus isolados foram identificados como H5N3 (1), H6N2 (3), H6N8 (2), H7N9 (1) e H9N2 (1). Os cinco vírus do subtipo H6 foram completamente sequenciados (RIMONDI et al., 2011). As análises realizadas a partir dos AIV isolados na Argentina e sequenciados sugerem que os vírus de influenza da América do Sul podem formar uma linhagem filogenética única.

Em 2003, o MAPA e o Ministério da Saúde realizaram inquéritos amostrais em aves migratórias e residentes do município de Galinhos – RN e do Parque Nacional da Lagoa do Peixe - RS, a fim de detectar a presença do vírus da febre do Nilo Ocidental e de outros vírus de importância, como o vírus da influenza aviária. Treze dos 22 *pools* de suabes cloacais colhidos de aves migratórias e de aves

residentes de Galinhos - RN e submetidos ao isolamento viral foram positivos para AI, tendo sido identificado AIV subtipo H3 de baixa patogenicidade (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004a). Já a partir dos 191 suabes cloacais colhidos de aves no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, foram detectados quatro *pools* positivos para AI, sendo dois isolados do subtipo H2 e dois do subtipo H4 do AIV (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004b). Posteriormente, sete diferentes isolados do vírus de influenza A detectados a partir das colheitas realizadas pelo MAPA em aves migratórias e/ou silvestres entre os anos de 2003 e 2006 foram subtipificados como sendo H2N3, H2N6, H3N8 e H4N6 (CAMILLO et al., 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAS

As amostras foram colhidas de aves de subsistência (galinhas, perus, patos, gansos, marrecos, galinhas-de-Angola) criadas no entorno de sítios de aves migratórias localizados nos estados da Bahia (BA), Mato Grosso do Sul (MS), Pará (PA), Pernambuco (PE), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP) de 2011 a 2015.

Os sítios de aves migratórias foram selecionados de acordo com os critérios previstos no Plano de Prevenção à Influenza Aviária em Aves Silvestres e de Subsistência elaborado e implantado pelo Grupo Executivo Interministerial para Implantação do Plano Brasileiro de Preparação para uma Pandemia de Influenza (GEI) instituído pelo Decreto Presidencial de 24 de outubro de 2005.

De acordo com o Plano de Prevenção à Influenza Aviária, os critérios para a seleção dos sítios de aves migratórias com risco em relação à influenza aviária foram os seguintes:

- I. Áreas de concentração de aves migratórias aquáticas (Anseriformes e Charadriiformes) com positividade para IA de baixa patogenicidade em inquéritos anteriores;
- II. Áreas de concentração de Anseriformes silvestres e/ou domésticos na proximidade de áreas úmidas (alagadiças), com concentração de população humana e com criação de aves (comercial e de subsistência);
- III. Áreas de concentração e/ou reprodução de aves migratórias aquáticas (Anseriformes e Charadriiformes), em áreas continentais ou em até 30 km da costa, sem informação epidemiológica, associadas à concentração de população humana e criação de aves (comercial e de subsistência).

O Quadro 2 apresenta os sítios de aves migratórias monitorados neste trabalho.

Quadro 2 - Sítios de aves migratórias monitorados e critérios de seleção adotados de acordo com o Plano de Prevenção à Influenza Aviária

Sítio	Município	UF	Crítérios
Mangue Seco	Jandaíra	BA	1 e 2
Cacha Pregos	Itaparica	BA	3
Pantanal	Corumbá	MS	3
Ilha de Marajó	Breves, São S. da Boa Vista	PA	2 e 3
Baía de Marajó	São Caetano de Odivelas	PA	2 e 3
Coroa do Avião	Igarassu	PE	1 e 2
ESEC Taim	Santa Vitória do Palmar	RS	2 e 3
Foz do Rio Araranguá	Araranguá	SC	2 e 3
Foz do Rio Tijucas	Tijucas	SC	2 e 3
Ilha do Cardoso e Ilha Comprida	Cananéia e Ilhas costeiras	SP	2 e 3

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

A execução das atividades de monitoria em aves de subsistência é descentralizada, sendo de responsabilidade das UFs onde estão localizados os sítios. A programação das colheitas oficiais para monitoramento de sítios de aves migratórias foi previamente comunicada à Coordenação de Sanidade Avícola (CSA) do Departamento de Saúde Animal (DSA) do MAPA pelo SVO de cada UF. Foram informados, com antecedência mínima de 30 dias, a data prevista da expedição, o local da colheita e uma estimativa do quantitativo de amostras a serem colhidas. Cabe às UFs a organização das colheitas e a determinação da periodicidade destas, de acordo com a disponibilidade de recursos financeiros e de pessoal.

A vigilância epidemiológica para influenza aviária foi realizada em explorações de aves de subsistência localizadas ao redor de 10 Km dos sítios de aves migratórias, sendo que o número de explorações e o número de aves a serem amostradas em cada exploração foram definidos de acordo com os seguintes critérios:

a) Para explorações com galinhas, perus e codornas: o número de explorações foi definido de forma a assegurar a identificação de, pelo menos, uma exploração infectada, se a prevalência de explorações infectadas for de pelo menos 5%, com intervalo de confiança de 95% e sensibilidade de 99%. O número de explorações para esta categoria de aves está demonstrado no Quadro 3.

Quadro 3 - Número de explorações amostradas de galinhas, perus e codornas com relação ao número de explorações existentes na região estudada

Número de explorações (galináceos)	Número de explorações amostradas
Até 27	Todas
28 a 34	28
35 a 50	35
51 a 80	42
81 a 250	53
251 a 500	56
Maior de 500	59

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

O número de galinhas, perus e codornas a ser amostrado em cada exploração foi definido de forma a garantir, com probabilidade de 95%, a identificação de pelo menos uma ave soropositiva, considerando que a prevalência de aves soropositivas seja igual ou superior a 30%. O Quadro 4 demonstra o número de aves destas espécies que foram amostradas em cada exploração.

Quadro 4 - Número de galinhas, perus e codornas amostrados em relação ao número de aves existentes em cada exploração

Número de galináceos/exploração	Número de aves a serem amostradas
4	Todas
5 a 8	5
9 a 13	6
14 a 24	7
25 a 78	8
79 a 200	9
Maior de 200	10

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

b) Para explorações com anseriformes: o número de explorações com anseriformes a amostrar foi definido a forma a assegurar a identificação de, pelo menos, uma exploração infectada se a prevalência de explorações infectadas for de, pelo menos, 5% com intervalo de confiança e sensibilidade de 99%. O número de explorações de anseriformes amostradas está apresentado no Quadro 5.

Quadro 5 - Número de explorações de anseriformes amostradas com relação ao número de explorações existentes na região estudada

Número de explorações de anseriformes	Número de explorações a serem amostradas
Até 46	Todas
47 a 60	47
61 a 100	59
101 a 350	80
Maior de 350	90

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

O número de anseriformes a ser amostrado em cada exploração foi definido de forma a garantir, com probabilidade de 95%, a identificação de pelo menos uma ave soropositiva, considerando que a prevalência de aves soropositivas seja igual ou superior a 30%. Sendo assim, em cada exploração com anseriformes foram colhidas amostras de 20 aves.

A fim de auxiliar na seleção das explorações a serem amostradas foram elencados fatores aos quais foram atribuídos pesos. Todos os fatores receberam peso 1, com exceção do item “a”, ao qual foi atribuído peso 2. Foram amostradas as propriedades que concentraram o maior número possível de fatores e, portanto, que obtiveram a maior pontuação:

- a) Existência de aves anseriformes;
- b) Presença de mais de uma espécie de ave na mesma exploração;
- c) Alta densidade de aves;
- d) Existência de pontos de atração (como lagos e açudes) de aves silvestres;
- e) Evidência de contato próximo entre aves domésticas e aves migratórias;
- f) Presença de aves de múltiplas idades;
- g) Ocorrência de comercialização de aves e seus produtos;
- h) Aves criadas em liberdade;
- i) Utilização de água superficial para servir de água de bebida às aves.

Os materiais foram colhidos pelo Serviço Veterinário Oficial como parte das atividades de vigilância ativa para influenza aviária realizadas pelo MAPA e consistiam de amostras de soro, suabes de cloaca e suabes de traqueia. Estas amostras foram colhidas de acordo com as orientações previstas na Nota Técnica CSA nº 16/2012 (Vigilância epidemiológica para influenza aviária e doença de

Newcastle em sítios de aves migratórias) e no protocolo descrito no Anexo VI (Procedimentos para necropsia, colheita de amostras e envio ao laboratório) do Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle do MAPA (2013).

As amostras de soro foram acondicionadas em microtubos de 2 ml e encaminhadas resfriadas (2°C a 8°C) ou congeladas (-20°C) ao Laboratório Nacional Agropecuário em São Paulo (Lanagro-SP). Já os suabes de cloaca e traqueia foram colhidos individualmente e acondicionados em microtubos contendo 1 ml de um dos meios de transporte preconizados no Anexo VII do Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle (2013). Após a colheita, o material foi armazenado a -80°C ou temperaturas inferiores até o momento do encaminhamento ao Lanagro-SP.

No momento da chegada dos materiais no laboratório, estes foram registrados e procedeu-se a triagem e armazenamento das amostras. Amostras de soro lipêmicas, hemolisadas ou com indícios de contaminação bacteriana foram consideradas inadequadas para análise e descartadas. Suabes de cloaca e/ou traqueia encaminhados sem meio de transporte ou em meios não preconizados pelo PNSA também foram considerados inadequados e descartados. Os suabes de cloaca e traqueia foram processados individualmente ou em *pools* de até cinco suabes. Os *pools* foram constituídos por suabes do mesmo tipo (cloaca ou traqueia), de aves da mesma exploração e da mesma espécie.

A fim de preservar a integridade do material até a realização dos ensaios, as amostras de soro foram armazenadas a -20°C e os suabes a -80°C.

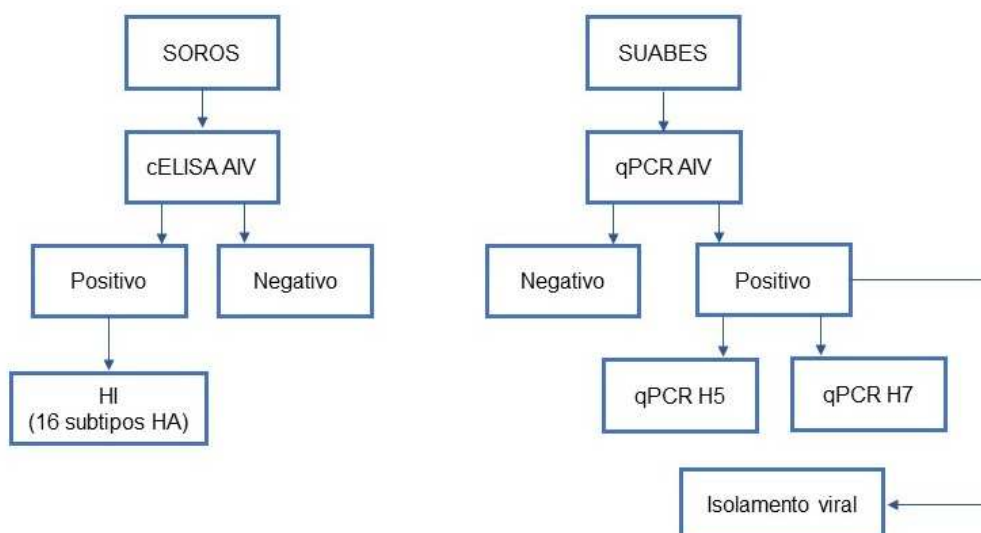
3.2 ENSAIOS LABORATORIAIS

Todos os ensaios laboratoriais foram realizados nas dependências da Unidade de Sanidade Aviária do Laboratório Nacional Agropecuário em São Paulo (Lanagro-SP), de acordo com os requisitos da NBR ISO:IEC 17025:2005.

As provas laboratoriais empregadas neste trabalho estavam de acordo com aquelas recomendadas pela OIE (2015) com o propósito de vigilância para influenza aviária.

A Figura 4 apresenta o fluxograma de trabalho empregado para as análises laboratoriais.

Figura 4 - Fluxograma de trabalho empregado para as análises laboratoriais



Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

3.2.1 cELISA

Todas as amostras de soro colhidas foram submetidas a um teste de ELISA competitivo (cELISA AIV) utilizando-se, para isso, o *kit* comercial *Biochek Type A Influenza Multispecies Antibody Test Kit*. Este *kit* detecta anticorpos para a NP do vírus influenza A a partir de amostras de soro de qualquer espécie animal.

De maneira bastante simples, as amostras de soro foram diluídas e acrescentadas aos poços de uma microplaca sensibilizada com antígeno inativado oriundo da nucleoproteína do vírus influenza A. Qualquer anticorpo para influenza A presente na amostra competia com anticorpos monoclonais anti-influenza A conjugados com fosfatase alcalina. Anticorpos não específicos e proteínas séricas eram removidos nas lavagens.

Previamente à realização da prova de cELISA AIV as amostras de soro foram diluídas a 1:50 em tampão diluente de amostra e procedeu-se também o preparo do

substrato e da solução de lavagem, de acordo com as orientações do fabricante. Todos os reagentes foram mantidos à temperatura ambiente antes do início da prova para estabilização. O ensaio foi realizado de acordo com o seguinte protocolo:

- a) As placas impregnadas com o antígeno foram removidas do envelope e a posição das amostras na placa foi preenchida no *template*;
- b) 50 µl do controle negativo foram adicionados aos orifícios A1 e B1;
- c) 50 µl do controle positivo foram adicionados aos orifícios C1 e D1;
- d) 50 µl de cada uma das amostras a serem testadas foram adicionados a cada um dos poços de placa, de acordo com o *template*;
- e) 50 µl do conjugado foi agregado a cada um dos poços;
- f) A placa foi então coberta e incubada durante 60 min à temperatura ambiente (18°C a 23°C);
- g) Após este período de incubação, procedeu-se a lavagem da placa em lavadora automatizada. Foram realizados 4 ciclos de aspiração e dispensa de 350 µl da solução de lavagem;
- h) Em seguida, a placa foi invertida e batida vigorosamente contra papel absorvente;
- i) Foram adicionados então 100 µl do substrato a cada um dos poços e a placa coberta foi novamente incubada à temperatura ambiente por 30 min;
- j) Ao final deste período, foram adicionados a todos os poços 100 µl da solução bloqueadora. A placa foi lida em espectrofotômetro a 450 nm e os dados foram automaticamente transferidos para o *software* responsável pela interpretação dos resultados (*Biochek II Diagnostic Software*).

3.2.1.1 Interpretação dos resultados

Para que a corrida fosse considerada válida, a média das absorbâncias dos controles negativos deveria ser menor do que 0,4 e a diferença entre a média dos controles negativos e a média dos controles positivos deveria ser maior do que 0,15.

A quantidade relativa de anticorpos para influenza A presente nas amostras foi calculada pelo *software* do fabricante, pela referência com o controle negativo

(razão S/N – *Sample to Negative Ratio*). Dessa forma, as amostras com razão S/N menor ou igual a 0.6 foram consideradas positivas (título maior ou igual a 938).

3.2.2 Prova de inibição da hemaglutinação

Todas as amostras de soro com resultado positivo ao teste de cELISA foram submetidas à prova de inibição da hemaglutinação (HI) para pesquisa de anticorpos para os dezesseis subtipos do vírus da influenza aviária (H1 a H16). A prova de HI foi realizada de acordo com a metodologia descrita no *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals* (OIE, 2015), utilizando-se antígenos e soros controle positivos homólogos inativados, produzidos pelo Instituto Zooprofilático Experimental de Veneza (IZSve), laboratório de referência da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), específicos para cada subtipo viral (Quadro 6). Para realização da prova de HI foram cumpridas as etapas descritas a seguir.

3.2.2.1 Hemaglutinação (HA)

A fim de determinar o título inicial de cada um dos antígenos a serem empregados na prova de HI, os mesmos foram submetidos à prova de hemaglutinação (HA). Para realização desta prova foram utilizadas microplacas transparentes de poliestireno com 96 orifícios e fundo em “V”, assim como suspensão de hemácias de galos SPF (*Specific Pathogen Free*) a 1% e PBS (solução salina fosfatada tamponada) pH 7.2 ± 0.2 ou solução salina 0,85%. A técnica de HA foi realizada de acordo com o seguinte protocolo:

- a) 25 μ l de PBS foram dispensados a cada um dos poços de uma microplaca com fundo em “V” com auxílio de uma micropipeta multicanal calibrada;
- b) Após, 25 μ l do antígeno inativado de interesse foram agregados ao primeiro poço da microplaca;

- c) A partir daí, foram feitas diluições seriadas na base 2, transferindo-se 25 µl do poço inicial ao segundo orifício e assim, sucessivamente, até o último orifício da linha, descartando-se os 25 µl finais;
- d) 25 µl de uma suspensão de hemácias de galos SPF a 1% foi adicionado a cada um dos orifícios, a microplaca foi vedada e incubada por 30 min à temperatura ambiente (18°C a 23°C);
- e) Ao final do período de incubação, foi realizada a leitura da prova para determinação do título do antígeno em unidades hemaglutinantes (UHA). O título inicial para cada um dos antígenos empregados pode ser observado no Quadro 6.

3.2.2.2 Preparo dos antígenos para a prova de HI

A partir dos resultados obtidos na etapa anterior, os antígenos foram diluídos em PBS com 0,4% de soro-albumina bovina e azida sódica de forma a se obter uma concentração de 4 UHA/25 µl. Após a diluição, os antígenos foram novamente titulados conforme 3.3.1 a fim de se verificar se a diluição realizada realmente resultava em 4 UHA/25 µl.

3.2.2.3 Preparo das amostras de soro

Amostras de soro de algumas espécies de aves podem auto aglutinar devido à presença de aglutininas séricas inespecíficas. Para evitar esse efeito, foi realizado o tratamento prévio das amostras por meio de adsorção com uma suspensão de hemácias de galos SPF a 10%, conforme protocolo a seguir:

- a) 100 µL de PBS pH 7.2 ± 0.2 ou solução salina 0,85% foram adicionados a um microtubo;

- b) Após, foram adicionados 50 μL da amostra de soro a ser tratada e 50 μL da suspensão de hemácias a 10%;
- c) Os microtubos foram homogeneizados a cada 10 minutos, durante 30 minutos, a fim de manter as hemácias em suspensão;
- d) Ao final do período, os microtubos foram deixados em repouso, por aproximadamente 30 minutos, a fim de propiciar a completa sedimentação das hemácias ao fundo do microtubo;
- e) O sobrenadante foi então transferido para um novo microtubo e a amostra (neste caso diluída 1:4) foi utilizada para realização da prova de HI.

3.2.2.4 Prova de HI

- a) 25 μL de PBS pH 7.2 ± 0.2 ou solução salina 0,85% foram adicionados a cada um dos orifícios de uma microplaca transparente de poliestireno com 96 orifícios e fundo em “V”;
- b) Com auxílio de uma micropipeta monocanal calibrada, foram adicionados 25 μL de cada amostra de soro a ser testada no primeiro orifício de cada fileira da placa;
- c) Foram feitas diluições seriadas na base 2 com micropipeta multicanal calibrada da seguinte forma:
 - i. 25 μL do primeiro orifício da linha foi aspirado (por exemplo: orifício A1);
 - ii. A seguir, estes 25 μL foram colocados no segundo orifício da mesma linha (por exemplo: A2);
 - iii. O conteúdo foi então homogeneizado três vezes com auxílio da micropipeta multicanal;
 - iv. 25 μL foram aspirados e dispensados no próximo orifício da mesma linha (por exemplo: A3);
 - v. Estes procedimentos foram repetidos ao longo de todos os orifícios da linha e desprezou-se os 25 μL finais;

- d) Após realizar a diluição das amostras de soro, foram adicionados 25 μ L do antígeno com quatro UHA a todos os orifícios da microplaca (exceto nos orifícios do controle das hemácias), homogeneizando suavemente ao final;
- e) Os passos anteriores foram repetidos para cada um dos subtipos de hemaglutinina;
- f) A microplaca foi coberta com tampa de silicone e incubada por 30 minutos a temperatura ambiente (18°C a 23°C);
- g) Após este período, foram adicionados, a cada orifício, 25 μ L de uma suspensão de hemácias de galos SPF a 1%;
- h) A microplaca foi homogeneizada suavemente, coberta e incubada por 30 min à temperatura ambiente;
- i) Ao final deste período de incubação foi realizada a leitura da prova, inclinando-se a microplaca e observando a presença (positivo) ou ausência (negativo) da inibição da hemaglutinação (“lágrima” escorrendo).
- j) O teste foi considerado válido apenas quando:
 - i. o antígeno utilizado possuía 4 UHA/25 μ L;
 - ii. o soro controle positivo homólogo apresentasse título $\geq 1:16$;
 - iii. o soro controle negativo apresentasse título inferior a 1:4 e não apresentasse hemaglutinação inespecífica.

3.2.2.5 Interpretação dos resultados

O título de HI foi considerado como sendo a maior diluição do soro em teste capaz de causar inibição completa das quatro UHA do antígeno. Somente os orifícios que apresentaram inibição completa (aspecto de “lágrima escorrendo”) foram considerados para a determinação do título. Orifícios que apresentaram inibição incompleta foram registrados, mas não considerados para a determinação do título. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram título $\geq 1:16$.

Quadro 6 - Antígenos empregados para a realização da prova de inibição da hemaglutinação (HI) para pesquisa de anticorpos para o vírus da influenza aviária

Antígeno	Cepa viral	Título (Em UHA)
H1N1	A/duck/Italy/1447/05 (H1N1)	512
H2N3	A/duck/Germany/1215/73 (H2N3)	128
H3N8	A/pass/It/6000/V00 (H3N8)	64
H4N8	A/cockatoo/England/72 (H4N8)	512
H5N9	A/chicken/Italy/22A/98 (H5N9)	32
H6N2	A/turkey/Canada/65 (H6N2)	1024
H7N3	A/turkey/Italy/9289/V02 (H7N3)	256
H8N4	A/turkey/Ontario/6118/68 (H8N4)	512
H9N2	A/turkey/Wisconsin/66 (H9N2)	1024
H10N1	A/ostrich/South Africa/01 (H10N1)	256
H11N9	A/duck/Memphis/546/174 (H11N9)	512
H12N5	A/duck/Alberta/60/76 (H12N5)	1024
H13N6	A/gull/Maryland/704/77 (H13N6)	256
H14N5	A/mallard/Gurjev/263/82 (H14N5)	256
H15N9	A/wedge-tailed shearwater/Western Australia/2576/79 (H15N9)	256
H16N3	A/gull/Denmark/68110/02 (H16N3)	256

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

3.2.3 Real-Time PCR para detecção de ácidos nucleicos dos vírus influenza A e dos subtipos H5 e H7

3.2.3.1 Extração automatizada de ácidos nucleicos totais

Previamente à realização da prova de qPCR, foi realizada a extração de ácidos nucleicos totais a partir do meio de transporte onde foram acondicionados os suabes de cloaca e traqueia.

Para tanto, os microtubos contendo os suabes foram descongelados, homogeneizados por agitação e o meio de transporte transferido para um frasco estéril, dando origem ao inóculo. Os suabes, de acordo com as possibilidades, foram processados individualmente ou agrupados em *pools* de 5.

A extração de ácidos nucleicos totais foi realizada na estação de trabalho automatizada *MagNA Pure LC 1.0* (Roche), utilizando-se o *kit* comercial *MagNA Pure LC Total Nucleid Acid Isolation Kit* (Roche).

Para realização da extração pelo equipamento, foram preparados cartuchos de extração. Em cabine de segurança biológica, a cada poço de um cartucho foram acrescentados 350 µL da solução de lise fornecida com o *kit* de extração e 100 µL dos inóculos previamente preparados. Adicionalmente, 1,5 µL do controle interno de extração (*Xeno™ RNA Control*) foi acrescentado a cada poço. Além disso, a cada cartucho foram adicionados dois controles negativos (água livre de nucleases), dois controles positivos do *kit* de reação de PCR (*SIV-Xeno™ RNA Control Mix*) e um controle positivo para AIV-M (vírus influenza A inativado). Após a finalização do cartucho, o mesmo foi armazenado a -80°C até seu processamento.

A extração de ácidos nucleicos no equipamento *MagNA Pure LC 1.0* foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.3.2 PCR em tempo real para detecção de ácido nucleico do vírus influenza A

A detecção molecular do vírus influenza A foi realizada por qPCR a partir das amostras eluídas obtidas na etapa anterior. Para realização da prova de qPCR foi utilizado o *kit VetMAX™- Gold SIV Detection Kit* (Life Technologies Corporation, Texas, EUA), comercializado pela Thermo Fisher Scientific.

Trata-se de um ensaio *multiplex* que utiliza três pares de *primers*, sendo dois deles dirigidos para regiões do gene M (matriz) e um para uma região da NP (nucleoproteína) do vírus influenza A. O *kit* é constituído de todos os reagentes necessários para uma reação de *Real Time* RT-PCR em um único passo.

Para cada reação de qPCR foram adicionados aos poços de uma microplaca 12,5 µL de *2X Multiplex RT-PCR Buffer*, 2,5 µL de *Multiplex RT-PCR Enzyme Mix*, 1,0 µL de *Influenza Virus Primer/Probe Mix*, 1,0 µL de água livre de nucleases e 8 µL do RNA extraído de cada material a ser testado, totalizando 25 µL/reação.

Em cada corrida foram adicionados também dois controles negativos (água livre de nucleases), pelo menos um controle positivo para AIV-M (RNA viral extraído

de um AIV inativado), dois controles positivos do *kit (Influenza Virus - Xeno™ RNA Control Mix)*, um controle interno da extração (*Xeno™ RNA Control*) e um controle negativo do procedimento de extração (tampão de lise e *Xeno™ RNA Control*).

As reações de qPCR foram realizadas em plataforma *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*, sendo as condições de PCR as seguintes: 48°C por 10 min (1 ciclo), 95°C por 10 min (1 ciclo), 95°C por 15 seg (40 ciclos) e 60°C por 45 seg para finalização.

A leitura dos resultados foi realizada com o auxílio do programa *7500 System SDS Software* e o *threshold* (nível de fluorescência onde a reação é detectada durante a fase exponencial) foi definido automaticamente pelo programa.

As amostras consideradas positivas ou suspeitas a este ensaio foram submetidas às provas de qPCR específicas para detecção dos subtipos H5 e H7 do AIV.

3.2.3.3 PCR em tempo real para detecção de ácido nucleico dos subtipos H5 e H7

Todas as amostras consideradas positivas ou suspeitas no ensaio de detecção molecular do vírus influenza A (qPCR AIV) detalhado anteriormente foram submetidas aos ensaios específicos para o diagnóstico molecular dos subtipos H5 e H7 do AIV por qPCR.

Os ensaios foram realizados de acordo com os protocolos descritos por Spackman et al. (2002) e pelo *National Veterinary Services Laboratory (NVSL)*, laboratório do Departamento de Agricultura Norte-Americano (USDA) e de referência para influenza aviária e doença de Newcastle da OIE.

Para realização da prova de qPCR em um único passo foi utilizado o *kit AgPath-ID™ One-Step RT-PCR Reagents (Life Technologies Corporation)*.

As provas para detecção dos subtipos H5 e H7 tratam-se de ensaios *multiplex*, sendo realizada uma reação para detecção do subtipo H5 (linhagens norte-americana, euroasiática e mexicana) e outra para detecção do subtipo H7

(linhagens pan-americana e euroasiática). Os *primers* e sondas utilizados para cada um destes ensaios estão descritos nos Quadros 7 e 8.

O ensaio para detecção do subtipo H5 (qPCR H5) tem como alvo o gene da hemaglutinina. O protocolo utilizado possui três *primers* senso, um *primer* reverso e duas sondas. Um *set* consiste de dois *primers* senso e uma sonda para detecção das linhagens norte-americana (AM) e euroasiática (EA) dos vírus H5 e o segundo *set*, constituído por um *primer* senso e uma sonda, é direcionado para detecção da linhagem mexicana (MX) do vírus influenza A subtipo H5. Os dois *sets* de *primers* e sondas utilizam um único *primer* reverso.

O ensaio para detecção do subtipo H7 (qPCR H7) também possui como alvo o gene da hemaglutinina. O ensaio *multiplex* utilizado possui dois *sets* de *primers* e sondas para detecção de linhagens americanas (AM) e euroasiáticas (EA) dos vírus influenza A subtipo H7.

Para detecção dos subtipos H5 e H7 foram utilizados, por reação (25 µL), 12,5 µL de *2X RT-PCR Buffer*, 0,25 µL de cada um dos iniciadores e das sondas (de forma a obter uma concentração final de 0,2 pmol/µL de *primers* e de 0,06 pmol/µL de sondas), 1,0 µL de *25X RT-PCR Enzyme Mix*, 2,0 µL de água livre de nucleases e 8,0 µL de RNA extraído de cada uma das amostras a serem testadas.

Adicionalmente, controles foram agregados a cada corrida, sendo dois controles negativos (água livre de nucleases) e, pelo menos, um controle positivo constituído de RNA extraído de cada um dos subtipos do AIV (H5N2 e/ou H7N1).

As reações de qPCR foram realizadas em plataforma *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System*. Para o ensaio de detecção do subtipo H5 as condições de PCR foram as seguintes: 45°C por 10 min (1 ciclo), 95°C por 10 min (1 ciclo) e 40 ciclos de 94°C por 10 seg, 57°C por 30 seg e 72°C por 5 seg. Já para o ensaio de detecção do subtipo H7, as condições de qPCR foram as que seguem: 45°C por 10 min (1 ciclo), 95°C por 10 min (1 ciclo) e 45 ciclos de 94°C por 10 seg, 54°C por 30 seg e 72°C por 10 seg.

3.2.3.4 Interpretação dos resultados

Os ensaios para detecção molecular do IAV foram considerados válidos quando:

- a) Pelo menos um controle positivo apresentou uma curva sigmóide e C_t (*cycle threshold*) de, aproximadamente, 25;
- b) O controle positivo incluído no *kit* (*SIV - Xeno™ RNA Control Mix*) apresentou um C_t entre 25 e 29;
- c) O controle negativo apresentou C_t indeterminado (zero);
- d) O controle interno da extração (*Xeno™ RNA Control*) apresentou uma curva sigmóide e foi positivo para o ensaio realizado.

Caso uma das condições acima não fosse atendida, os ensaios eram repetidos.

Foram consideradas positivas para influenza A aquelas amostras que apresentaram $C_t < 38$ (de 1 a 37.9). Amostras com C_t variando de 38 a 40 foram consideradas suspeitas e todas as amostras que apresentassem C_t igual a zero ou indeterminado foram consideradas negativas. Quaisquer amostras com resultados questionáveis ou duvidosos foram retestadas em triplicata.

Já os ensaios de detecção dos subtipos H5 e H7 foram considerados válidos quando, pelo menos, um dos controles positivos para H5 e para H7 apresentaram curva sigmoide e C_t de, aproximadamente, 25. Além disso, os controles negativos deveriam apresentar C_t indeterminado (zero). A extração foi anteriormente validada no ensaio para detecção de influenza A.

As amostras foram consideradas positivas para o subtipo H5 quando apresentaram $C_t \leq 40$ e foram classificadas positivas para o subtipo H7 quando apresentaram $C_t \leq 45$. Amostras com C_t igual a zero ou indeterminado foram consideradas negativas.

Quadro 7 - Sequências dos pares de iniciadores e sondas para detecção do subtipo H7 do AIV

Oligonucleotídeos	Nome	Sequência (5' – 3')
Iniciador senso	H7+1515 F	ATG GAG AGC ATA AGG AAC
Sonda	H7+1585 <i>probe</i>	FAM – CAG ATA GAC CCA GTG AAA TTG AGT – BHQ-1
Iniciador reverso	H7-1628 R	CCG AAG CTA AAC CAT AAG
Iniciador senso	H7 CODA F-MOD	GCA GYG GYT ACA AAG ATG TG
Sonda	H7 FLI-1649 <i>probe</i>	FAM – TGG TTT AGC TTC GGG GCA TCA TG - BHQ-1
Iniciador reverso	H7 CODA R	GGA GAC AAG GCC CAT TGC AA

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

Quadro 8 - Sequências dos pares de iniciadores e sondas para detecção do subtipo H5 do AIV

Oligonucleotídeo	Nome	Sequência (5' – 3')
Iniciador senso H5 norte-americano	H5+1456 NA	ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA
Iniciador senso H5 euroasiático	H5+1456 EA	ACG TAT GAC TAC CCG CAG TAT TCA
Sonda H5 norte-americano	H5+1637 <i>probe</i>	FAM – TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA – BHQ-1
Iniciador reverso H5	H5-1685	AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC
Iniciador senso H5 mexicano	H5 +1592 MX	AAT CAA CAG GGA CTT ATC AGA TAC
Sonda H5 mexicano	H5 +1680 MX <i>probe</i>	FAM – TCA ATC TAT TCT ACA GTA GTG AGT TCC CTA GCA CTG – BHQ-1

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

Foram encaminhadas ao laboratório amostras colhidas de 2816 aves de subsistência (galinhas, perus, patos, gansos, marrecos e galinhas-de-Angola) criadas no entorno de sítios de aves migratórias localizados nos estados da Bahia (BA), Mato Grosso do Sul (MS), Pará (PA), Pernambuco (PE), Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) e São Paulo (SP). As colheitas foram realizadas no período de 2011 a 2015 por médicos veterinários do Serviço Veterinário Oficial (SVO) de cada uma das Unidades Federativas (UFs) mencionadas.

A localização geográfica dos municípios amostrados pode ser observada na Figura 5.

Durante o período de realização do monitoramento, foram amostradas 391 explorações e colhidas amostras de 2816 aves. Deste total, 2230 (79%) amostras foram colhidas de galinhas, 103 (3,7%) de gansos, 40 (1,5%) de marrecos, 440 (15,7%) de patos e 3 (0,1%) de perus. O quantitativo de explorações e aves amostradas por sítio durante o período estudado está discriminado na Tabela 1, enquanto na Tabela 2 pode ser observado o número de aves amostradas por espécie segundo o sítio e a UF de origem dos materiais.

Tendo em vista que as amostras obtidas de galinhas-de-Angola não puderam ser diferenciadas como tais no laboratório por falha na identificação das mesmas a campo, todas foram agrupadas como galinhas.

Figura 5 - Localização geográfica dos municípios onde estão localizados os sítios de aves migratórias de onde foram colhidas amostras de aves de subsistência



Fonte: (REISCHAK, D., 2016).

Legenda: A – Santa Vitória do Palmar/RS; B – Porto Belo/SC; C - Tijucas/SC; D - Governador Celso Ramos/SC; E - Araranguá/SC; F - Içara/SC; G – Ilha Comprida/SP; H – Cananéia/SP; I – Corumbá/MS; J – Jandaíra/BA; K – Itaparica/BA; L - Igarassu/PE; M - Itapissuma/PE; N - Paulista/PE; O - São Caetano de Odivelas/PA; P – São Sebastião da Boa Vista/PA; Q – Breves/PA.

Tabela 1 - Número de explorações e aves amostradas por sítio de acordo com a UF de origem

Sítios por UF	Número de explorações amostradas	Número de aves amostradas
BA	57	287
Cacha Pregos	11	52
Mangue Seco	46	235
MS	25	404
Pantanal	25	404
PA	51	329
Baía de Marajó	7	29
Ilha de Marajó	44	300
PE	39	285
Coroa do Avião	39	285
RS	72	411
ESEC Taim	72	411
SC	132	843
Foz do Rio Araranguá	74	516
Foz do Rio Tijucas	58	327
SP	15	257
Ilha Comprida	8	129
Ilha do Cardoso	7	128
Total	391	2816

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

Tabela 2 - Número de aves amostradas por espécie de acordo com o sítio e a UF de origem

Sítios por UF	Número de aves amostradas por espécie					Total
	Galinha	Ganso	Marreco	Pato	Peru	
BA	245	1	0	41	0	287
Cacha Pregos	41	0	0	11	0	52
Mangue Seco	204	1	0	30	0	235
MS	404	0	0	0	0	404
Pantanal	404	0	0	0	0	404
PA	121	0	0	205	3	329
Baía de Marajó	13	0	0	16	0	29
Ilha de Marajó	108	0	0	189	3	300
PE	247	7	2	29	0	285
Coroa do Avião	247	7	2	29	0	285
RS	338	35	7	31	0	411
ESEC Taim	338	35	7	31	0	411
SC	632	60	31	120	0	843
Foz do Rio Araranguá	386	36	7	87	0	516
Foz do Rio Tijucas	246	24	24	33	0	327
SP	243	0	0	14	0	257
Ilha Comprida	115	0	0	14	0	129
Ilha do Cardoso	128	0	0	0	0	128
Total	2230	103	40	440	3	2816

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

4.2 PESQUISA DE ANTICORPOS PARA A PROTEÍNA NP POR cELISA

Do total de 2816 amostras de soro recebidas, 2726 foram submetidas à prova de cELISA AIV para pesquisa de anticorpos para influenza A, sendo que 101 amostras (3,7%) foram positivas. As amostras de soro consideradas inadequadas para análise (n = 90) foram descartadas no momento da chegada ao laboratório ou durante o processamento do material.

As galinhas representaram 93% das amostras positivas no cELISA AIV, sendo seguidas pelos patos (5,9%) e pelos gansos (0,9%). Não foram detectadas amostras positivas dentre os marrecos e perus.

Os resultados encontrados à prova de cELISA AIV, por UF e sítio de origem das amostras, se encontram na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequência de amostras positivas e negativas ao teste de cELISA AIV por UF e sítio de origem

UF e sítio de origem	Número de amostras positivas no cELISA AIV (%)	Número de amostras negativas no cELISA AIV (%)
BA	1 (0,04%)	249 (9,1%)
Cacha Pregos	0	16
Mangue Seco	1	233
MS	5 (0,2%)	381 (14%)
Pantanal	5	381
PA	3 (0,1%)	326 (12%)
Baía de Marajó	0	29
Ilha de Marajó	3	297
PE	4 (0,1%)	281 (10,3%)
Coroa do Avião	4	281
RS	31 (1,1%)	368 (13,5%)
ESEC Taim	31	368
SC	22 (0,8%)	799 (29,3%)
Foz do Rio Araranguá	13	500
Foz do Rio Tijucas	9	299
SP	35 (1,3%)	221 (8,1%)
Ilha Comprida	19	109
Ilha do Cardoso	16	112
Total	101 (3,7%)	2625 (96,3%)

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

Na Tabela 4 pode-se observar o número de amostras positivas e negativas ao teste de cELISA AIV de acordo com a espécie, o sítio e a UF de origem do material.

4.3 PROVA DE HI

Do total de 101 amostras positivas ao teste de cELISA, 79 (78,2%) foram submetidas à prova de HI na tentativa de se subtipificar para que tipo de hemaglutinina estes anticorpos foram dirigidos. Vinte e duas amostras de soro (20,8%) não puderam ser testadas, uma vez que o volume foi insuficiente para a realização do ensaio.

Não foi possível determinar o subtipo de hemaglutinina para 27 (34,2%) das 79 amostras de soro submetidas à prova de HI, sendo que 26 amostras foram obtidas de galinhas e uma de pato. Este fato não parece estar relacionado com o título de anticorpos determinados pela prova de cELISA, uma vez que outras amostras, com títulos menores, puderam ser subtipificadas. Dentre as 52 amostras que puderam ser subtipificadas, 49 foram colhidas de galinhas, uma de ganso e duas de patos.

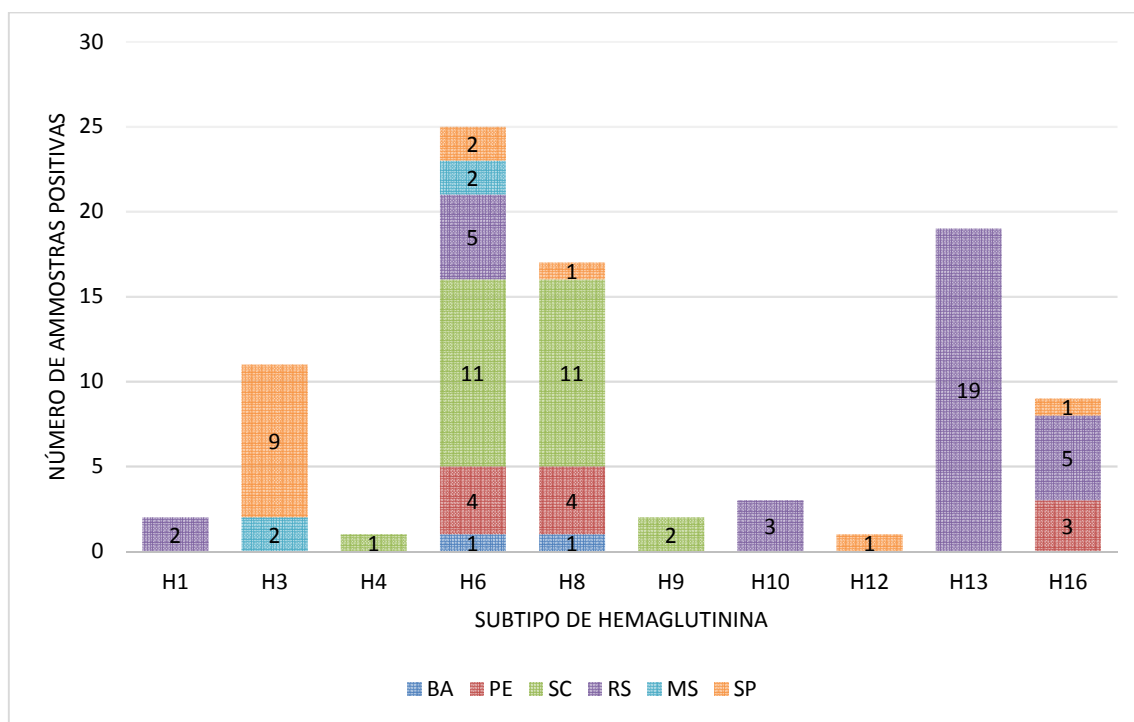
Os resultados encontrados ao teste de HI para os 16 subtipos de hemaglutinina do AIV estão discriminados no Quadro 9. Os subtipos para os quais não se encontraram amostras positivas não foram apresentados. A frequência de amostras positivas por estado de origem para cada subtipo de hemaglutinina está apresentada no Gráfico 1.

Tabela 4 - Número de amostras positivas e negativas ao teste de cELISA AIV de acordo com a espécie e o sítio de origem

Espécies por sítio e UF de origem	Número de amostras positivas no cELISA AIV	Número de amostras negativas no cELISA AIV
BA	1	249
Cacha Pregos	0	16
Galinha	0	14
Pato	0	2
Mangue Seco	1	233
Galinha	1	202
Ganso	0	1
Pato	0	30
MS	5	381
Pantanal	5	381
Galinha	5	381
PA	3	326
Baía de Marajó	0	29
Galinha	0	13
Pato	0	16
Ilha de Marajó	3	297
Galinha	0	108
Pato	3	186
Peru	0	3
PE	4	281
Coroa do Avião	4	281
Galinha	4	243
Ganso	0	7
Marreco	0	2
Pato	0	29
RS	31	368
ESEC Taim	31	368
Galinha	27	303
Ganso	1	31
Marreco	0	7
Pato	3	27
SC	22	799
Foz do Rio Araranguá	13	500
Galinha	13	372
Ganso	0	36
Marreco	0	7
Pato	0	85
Foz do Rio Tijucas	9	299
Galinha	9	219
Ganso	0	24
Marreco	0	24
Pato	0	32
SP	35	221
Ilha Comprida	19	109
Galinha	19	95
Pato	0	14
Ilha do Cardoso	16	112
Galinha	16	112
Total	101	2625

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

Gráfico 1- Frequência de amostras positivas, de acordo com cada subtipo do IAV, detectadas na prova de HI, por UF de origem das amostras de soro



Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

Quadro 9 - Resultados obtidos à prova de HI para subtipificação das amostras positivas ao teste de eELISA AIV

(continua)

ID amostra	Espécie	UF	Título ELISA	H1	H3	H4	H6	H8	H9	H10	H12	H13	H16
1	Galinha	BA	1589	Negativo	Negativo	Negativo	32	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
2	Galinha	PE	980	Negativo	Negativo	Negativo	32	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
3	Galinha	PE	1045	Negativo	Negativo	Negativo	16	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	16
4	Galinha	PE	983	Negativo	Negativo	Negativo	16	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	16
5	Galinha	PE	956	Negativo	Negativo	Negativo	32	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	16
6	Galinha	SC	940	Negativo	Negativo	Negativo	64	64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
9	Galinha	SC	990	Negativo	Negativo	Negativo	32	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
11	Galinha	SC	963	Negativo	Negativo	Negativo	32	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
12	Galinha	SC	944	Negativo	Negativo	64	32	64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
16	Galinha	SC	1202	Negativo	Negativo	Negativo	16	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
17	Galinha	SC	1893	Negativo	Negativo	Negativo	16	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
18	Galinha	SC	1757	Negativo	Negativo	Negativo	32	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
19	Galinha	SC	1065	Negativo	Negativo	Negativo	64	64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
20	Galinha	SC	966	Negativo	Negativo	Negativo	64	64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
21	Galinha	SC	990	Negativo	Negativo	Negativo	64	64	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
22	Galinha	SC	1030	Negativo	Negativo	Negativo	16	16	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
23	Galinha	RS	1323	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	16
24	Galinha	RS	1719	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
25	Galinha	RS	1233	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	16
26	Galinha	RS	1053	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
27	Galinha	RS	1033	Negativo	Negativo	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	16
28	Galinha	RS	979	Negativo	Negativo	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
29	Galinha	RS	1138	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	64	Negativo
30	Galinha	RS	1255	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
31	Galinha	RS	956	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
32	Galinha	RS	1096	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
33	Ganso	RS	1020	32	Negativo	Negativo	32	Negativo	Negativo	16	Negativo	32	Negativo
34	Galinha	RS	938	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo

(conclusão)

ID amostra	Espécie	UF	Título ELISA	H1	H3	H4	H6	H8	H9	H10	H12	H13	H16
35	Galinha	RS	1129	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
36	Galinha	RS	995	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	64	Negativo
37	Galinha	RS	962	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	16	Negativo
41	Galinha	RS	1015	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	16
42	Galinha	RS	962	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	16
44	Pato	RS	2352	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	64	Negativo	Negativo	Negativo
45	Pato	RS	1575	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
46	Galinha	RS	964	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
48	Galinha	RS	972	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo	16	Negativo
52	Galinha	RS	1094	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	32	Negativo
53	Galinha	MS	970	Negativo	Negativo	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
54	Galinha	MS	1010	Negativo	16	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
56	Galinha	MS	995	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
57	Galinha	SP	940	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
58	Galinha	SP	955	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
59	Galinha	SP	1001	Negativo	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
60	Galinha	SP	1006	Negativo	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
61	Galinha	SP	1017	Negativo	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
62	Galinha	SP	1022	Negativo	32	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
66	Galinha	SP	958	Negativo	32	Negativo	Negativo	32	Negativo	Negativo	16	Negativo	Negativo
67	Galinha	SP	1096	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
68	Galinha	SP	1164	Negativo	32	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
78	Galinha	SP	937	Negativo	Negativo	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	16
79	Galinha	SP	966	Negativo	16	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

4.4 PCR EM TEMPO REAL PARA INFLUENZA A

Foram colhidos suabes de cloaca e de traqueia de 2816 aves, o que resultou em 3163 reações de qPCR para detecção do vírus influenza A. Deste total, apenas três suabes de traqueia colhidos de galinhas de uma das explorações localizadas no sítio da Foz do Rio Araranguá (SC) resultaram positivos. Estas três alíquotas foram submetidas aos ensaios específicos para os subtipos H5 e H7 do AIV e resultaram negativas. Adicionalmente, também foram submetidas a prova de isolamento viral, mas não foi possível detectar a presença de qualquer agente hemaglutinante ao final de duas passagens consecutivas em ovos embrionados de galinhas SPF.

Na Tabela 5 é possível observar os resultados obtidos à prova de qPCR AIV realizadas a partir dos suabes de cloaca e traqueia colhidos de aves de subsistência no entorno dos diferentes sítios de aves migratórias.

Tabela 5 - Resultados obtidos à prova de qPCR AIV a partir de amostras de suabes de cloaca e traqueia, de acordo com o sítio e a UF de origem

UF e sítio de origem	Número de aves amostradas	Número de amostras positivas	Número de amostras negativas
BA	287	0	164
Cacha Pregos	52	0	31
Mangue Seco	235	0	133
MS	404	0	166
Pantanal	404	0	166
PA	329	0	149
Baía de Marajó	29	0	14
Ilha de Marajó	300	0	135
PE	285	0	124
Coroa do Avião	285	0	124
RS	411	0	819
ESEC Taim	411	0	819
SC	843	3	1626
Foz do Rio Araranguá	516	3	1018
Foz do Rio Tijucas	327	0	608
SP	257	0	112
Ilha Comprida	129	0	86
Ilha do Cardoso	128	0	26
Total Geral	2816	3	3160

Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

5 DISCUSSÃO

A presença de anticorpos para diferentes subtipos do AIV foi detectada pelo *kit* de cELISA para influenza A em aves oriundas de explorações de subsistência localizadas no entorno de nove dos onze sítios de aves migratórias monitorados pelo MAPA entre 2011 e 2015. Apenas nos sítios de Cacha Pregos e Baía de Marajó não foram identificadas aves sorologicamente positivas para influenza A. Estes resultados indicam que há circulação de vírus influenza A nas aves de subsistência dos sítios avaliados. Estes achados corroboram com os estudos de Alexander (2000b) e Hadipour (2010) que sugerem que as aves domésticas criadas ao ar livre possuem uma maior possibilidade de contato com aves silvestres, especialmente quando as criações estão situadas em regiões de rotas migratórias.

A presença de anticorpos para influenza A em aves de subsistência também já foi relatada por diversos autores (TERREGINO et al., 2007; ZHENG et al., 2010; EL-ZOGHBY et al., 2011; SABARINATH et al., 2011; SERRÃO et al., 2012; MADSEN et al., 2013; SHEKAILI et al., 2015). Na maioria dos estudos, esse tipo de exploração de aves foi monitorado justamente por ser considerado de alto risco para a introdução da influenza aviária, uma vez que se caracteriza pelas baixas condições de biossegurança, pela falta de manejo sanitário adequado e pela coexistência com outras espécies de animais (MADSEN et al., 2013a).

As explorações de aves de subsistência avaliadas neste trabalho estão situadas no entorno de áreas úmidas/alagadas que recebem, anualmente, aves migratórias que possuem seus sítios de reprodução na região circumpolar da América do Norte e Groenlândia, ou em áreas no sul da América do Sul e Antártida. As aves migratórias utilizam estes sítios para descanso e alimentação, sendo os mesmos importantíssimos para a conservação destas espécies (MOORE et al., 2005; ICMCBIO, 2016). Durante o período de permanência nestas regiões, que pode ser de horas a dias, inúmeras são as possibilidades de interação direta e indireta com aves silvestres residentes e com aves domésticas criadas de forma livre.

A introdução do AIV em uma população de aves domésticas não precisa, necessariamente, se dar pelo contato direto com aves silvestres infectadas; isso pode ocorrer quando as aves silvestres têm livre acesso às explorações familiares

ou quando as aves domésticas podem se deslocar pela vizinhança de suas criações sem restrições. As aves silvestres podem introduzir o vírus em uma determinada área e este poderá ser transmitido às aves domésticas por humanos e por outros tipos de aves e animais que não estejam, necessariamente, infectados, mas que possam carrear o AIV presente nas fezes das aves infectadas (ALEXANDER, 2007). Além disso, as águas de superfície contaminadas com o AIV podem também servir como fonte de infecção à aves domésticas (ALEXANDER, 2007; SWAYNE, 2007). Vale lembrar que esta via de exposição é de mão dupla e que aves de subsistência infectadas podem servir como fonte de infecção do AIV e de outras enfermidades zoonóticas para aves silvestres, aves comerciais e, inclusive, seres humanos (ELKHORAIBI et al., 2014; WHITEHEAD; ROBERTS, 2014).

De acordo com a OIE (2015), o HI com antígenos H5 e H7 é o teste sorológico recomendado para fins de vigilância, não havendo a necessidade de se associar outro ensaio. Neste trabalho, no entanto, utilizou-se a combinação de dois ensaios: o cELISA como teste de triagem e o HI como ensaio confirmatório. A utilização de ensaios competitivos de ELISA como teste de triagem em programas de vigilância se justifica pela possibilidade de automatização e pela elevada sensibilidade e especificidade do ensaio na detecção de anticorpos para influenza A (SHAFER; KATZ; EERNISSE, 1998; SONG et al., 2009; BROWN et al., 2010b; MARCHÉ; VAN DEN BERG, 2010). Além disso, o ELISA competitivo permite o processamento de um grande número de amostras em um curto intervalo de tempo e possibilita que amostras de múltiplas espécies de aves sejam testadas sem necessidade de qualquer tratamento prévio (STARICK et al., 2006; OIE, 2015). Por outro lado, a OIE (2015) recomenda que as amostras positivas em ensaios de ELISA competitivo sejam submetidas ao teste de HI para subtipificação dos anticorpos para H5 e H7.

Desta forma, boa parte das pesquisas realizadas até hoje em aves de subsistência centraram-se na detecção de anticorpos para os subtipos H5 e H7 (JOANNIS et al., 2008; COUACY-HYMANN et al., 2012b; MADSEN et al., 2013b) do AIV (por serem passíveis de notificação à OIE) e, esporadicamente, também para o subtipo H9 (PAWAR et al., 2012; SERRÃO et al., 2012).

O sorodiagnóstico representa uma metodologia barata e prática para avaliar a circulação e prevalência viral em aves domésticas. O teste de inibição da

hemaglutinação (HI) é simples, robusto e completamente validado, gerando informações qualitativas e quantitativas. O ensaio de HI exige um trabalho laboratorial mais intenso do que as provas de ELISA e AGID, mas produz informações que podem ser mais valiosas e úteis para a gestão de situações de campo, uma vez que fornece informações sobre o subtipo viral envolvido (CATTOLI; MONNE, 2009).

Para ter seu rendimento máximo, o HI necessita de painéis de antígenos e de antissoros padrões que contemplem todos os subtipos de hemaglutininas. Estes painéis são produzidos de forma restrita por laboratórios de referência internacional. Assim, o HI não é amplamente utilizado como ensaio de triagem diagnóstica, sendo mais comumente aplicado como teste confirmatório para subtipificar anticorpos em amostras que previamente resultaram positivas em outras provas (SPACKMAN; SUAREZ; SENNE, 2008).

Tendo em vista que se desconhece no Brasil a situação sanitária das aves de subsistência no que se refere à infecção pelos diferentes subtipos do AIV, as amostras de soro positivas no teste de triagem foram submetidas ao ensaio de HI frente aos dezesseis subtipos de hemaglutinina. Em nenhum estudo anterior realizado no Brasil, seja em aves de subsistência ou em aves comerciais, foi empregado o painel completo de antígenos para pesquisa de anticorpos para os dezesseis subtipos de HA. Para isso, foi utilizado um painel de antígenos e antissoros produzidos pelo *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie* (IZSve), laboratório de referência da OIE para o diagnóstico da influenza aviária.

A subtipificação das amostras de soro positivas no teste de cELISA evidenciou a presença de anticorpos para dez diferentes subtipos do AIV, mas não foram detectadas aves com anticorpos para os subtipos notificáveis H5 e H7. É possível perceber uma predominância de aves positivas para os subtipos H3, H6, H8 e H13, sendo que a frequência das amostras positivas para cada um destes subtipos parece estar relacionada à localização geográfica dos sítios. Enquanto anticorpos para o subtipo H3 foram identificados em aves dos sítios localizados no MS e SP, anticorpos para H6 e H8 foram encontrados em aves dos sítios nos estados de BA, PE, SC e RS e anticorpos para o subtipo H13 foram detectados apenas no sítio da Estação Ecológica do Taim (RS).

Todos os subtipos para os quais foram detectados anticorpos neste trabalho já foram anteriormente relatados em aves silvestres ou domésticas. De acordo com o Glossário do Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE (2016), animais silvestres ou selvagens são aqueles cujo fenótipo não foi afetado por seleção humana e que vivem independentes do controle e da supervisão de seres humanos. Já as aves domésticas, incluindo aqui as de subsistência, são todas aquelas populações que foram domesticadas e que são utilizadas para produção de carne ou ovos para consumo, para a produção de outros produtos comerciais, para reconstituição de plantéis destinados ao esporte ou reprodução de todas as categorias de aves, assim como galos de briga, independente dos fins para que são utilizados. Segundo a Instrução Normativa nº 56, de 4 de dezembro de 2007, estabelecimentos avícolas de reprodução incluem os plantéis de reprodutoras primárias (linha pura), bisavós, avós e matrizes de galinhas, marrecos, patos e perus; já os estabelecimentos avícolas comerciais são aqueles destinados à exploração de aves de corte (galinhas e perus), de postura comercial (galinhas) ou outras aves de produção, exóticas ou não.

O subtipo H3 do AIV já foi detectado em aves migratórias no Brasil durante inquérito realizado em Galinhos – RN em 2003 (ARAÚJO et al., 2004), sendo que algumas das espécies das quais o vírus foi isolado tem ocorrência registrada nos sítios do Pantanal (NUNES; TOMAS, 2004) e de Ilha Comprida (BARBIERI; PAES, 2008), como *Charadrius semipalmatus* (batuíra-de-bando), *Calidris fuscicollis* (maçarico-de-sobre-branco), *Calidris pusilla* (maçarico-rasteirinho) e *Pluvialis squatarola* (tarambola-cinzenta). Além disso, o subtipo H3 do AIV foi isolado também de aves de subsistência (galinhas) e de aves migratórias, a partir de amostras colhidas nos municípios de Salinópolis (PA) e Itamaracá (PE) como parte das atividades de vigilância ativa para influenza aviária realizadas pelo MAPA durante os anos de 2006 e 2007 (MOTA et al., 2013).

A existência de aves infectadas pelo subtipo H3 do AIV foi também relatada em atividades de vigilância realizadas na América do Norte. Nos EUA, por exemplo, a presença de anticorpos para este subtipo ou do próprio vírus foi detectada em amostras colhidas de diferentes populações de aves domésticas durante os períodos de 2006 a 2011, havendo detecção de anticorpos também em aves da República Dominicana, do Canadá e da Austrália (SENNE, 2010; PASICK;

PEDERSEN; HERNANDEZ, 2012). Adicionalmente, o H3 foi o subtipo de AIV mais frequentemente isolado durante os cinco anos de um programa de vigilância realizado, inicialmente, com o intuito de monitorar a infecção por HPAI em aves selvagens (BEVINS et al., 2014). Anticorpos para o subtipo H3 também foram detectados na China a partir de amostras obtidas em plantéis comerciais e de reprodução localizados nas maiores áreas de produção do país (PU et al., 2009).

Da mesma forma, a detecção de aves domésticas infectadas pelo AIV subtipo H6 já foi evidenciada no Canadá, nos Estados e na Austrália (SENNE, 2010; PASICK; PEDERSEN; HERNANDEZ, 2012). Na América do Sul, infecção pelo AIV subtipo H6 foi relatada na Argentina, a partir do isolamento do vírus de aves selvagens da espécie *Netta peposaca* (RIMONDI et al., 2011). Esta espécie, conhecida vulgarmente como marrecão, se reproduz no RS e nos países do Cone Sul e fora do período reprodutivo já foi observada nos estados de SP, RJ e MS (WIKIAVES, 2016). O envolvimento de vírus do subtipo H6 em surtos de LPAI em aves domésticas foi relatado nos Estados Unidos e na Europa (WOOLCOCK; SUAREZ; KUNEY, 2003; BROWN, 2010), assim como a presença deste subtipo em aves migratórias (MUNSTER et al., 2007; SCOTCH et al., 2014).

Na América do Sul, Argentina, Chile e Peru relataram a presença de aves migratórias infectadas pelo subtipo H13 do AIV. Na Argentina, um vírus H13N9 foi isolado de um *Larus dominicanus* (gaivotão) capturado no estuário de Baía Blanca, no sul da província de Buenos Aires (PEREDA et al., 2008). Já no Chile, dois vírus foram obtidos: um H13N2 e um H13N9 (MATHIEU et al., 2015); ambos foram isolados de *Leucophaeus pipixcan* (gaivota-de-franklin), espécie migratória que se reproduz na América do Norte e passa o período não reprodutivo na América do Sul, mais precisamente na costa do Pacífico (LEAL; SERAPIÃO; ALVES PEREIRA, 2013). O isolamento de um AIV H13N2 no Peru se deu a partir de duas espécies: *Larus dominicanus* (gaivotão) e *Numenius phaeopus* (maçarico-galego). Ambas as aves foram capturadas na região de Paraiso, na costa central do Peru (GHERSI et al., 2009).

As gaivotas são reconhecidas como reservatórios dos subtipos H13 e H16 do AIV (MUNSTER et al., 2007; GUINN et al., 2016), sendo que a primeira descrição do subtipo H16 foi feita a partir da caracterização de um vírus isolado de *Larus ridibundus* (guincho-comum) na Suécia (FOUCHIER et al., 2005). Coincidentemente,

aves domésticas com anticorpos para o subtipo H16 do AIV também foram encontradas neste trabalho (n = 9), mais precisamente nos sítios localizados em PE, RS e SP; quatro delas possuíam anticorpos também para o subtipo H13.

O gaivotão *Larus dominicanus* é uma espécie marinha com distribuição circumpolar, se reproduzindo na costa e em ilhas do hemisfério sul e se distribuindo pelas ilhas subantárticas, na península Antártica, na costa sul da Austrália e por toda Nova Zelândia, na costa sul da África e Madagascar e nas costas Atlântica e Pacífica da América do Sul (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2016). No Brasil, o gaivotão é o larídeo mais comum na costa brasileira, podendo ser observado desde o RS até o RJ, com registros esporádicos na região Nordeste (MATTA, 2014). Larídeos já foram observados na ESEC do Taim (WIKIAVES, 2016), no estuário de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida (BARBIERI, 2008) e também no sítio de Coroa do Avião (TELINO-JÚNIOR; AZEVEDO-JÚNIOR; LYRA-NEVES, 2003), sítios estes onde aves de subsistência com anticorpos para este subtipo foram detectadas. As gaivotas são aves com hábitos alimentares generalistas e oportunistas, o que lhes permite a exploração de fontes antrópicas de alimento, tendo sido observadas em áreas de descarte de lixo e de águas servidas e em locais onde há resíduos de atividades pesqueiras (GIACCARDI, M.; YORIO, P.; LIZURUME, 1997).

Já o maçarico-galego trata-se de uma espécie limícola que está presente em várias regiões do mundo, se reproduz no Ártico e migra para a América do Sul, África, Ásia e Austrália (ALL ABOUT BIRDS, 2015). No Brasil, esta espécie foi observada em Galinhos – RN (LARRAZÁBAL, M. E; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M.; PENA, 2002), no sítio de Coroa do Avião - PE (TELINO-JÚNIOR; AZEVEDO-JÚNIOR; LYRA-NEVES, 2003), em Tijucas – SC (GHIZONI-JR; AZEVEDO, 2010), na praia do Cassino – RS (BENCKE et al., 2010) e na Ilha dos Caranguejos – MA (CARVALHO; RODRIGUES, 2011).

Anticorpos para o subtipo H8 foram detectados nos Estados Unidos em emas (*Rhea americana*), emus (*Dromaius novaehollandiae*) e avestruzes (PANIGRAHY; SENNE; PEARSON, 1995; SENNE, 2010), demonstrando que as ratitas são susceptíveis à infecção por este subtipo do AIV. Relatos de anticorpos para H8 também foram feitos em gaivotas-prateadas (*Larus argentatus*) capturadas na Baía de Delaware (GUINN et al., 2016) e em gansos canadenses (*Branta canadensis*) também capturados nos EUA (KISTLER et al., 2015). Quanto ao isolamento do AIV

H8, os relatos também são raros. Um vírus H8N4 foi isolado de um pato-real (*Anas platyrhynchos*) do estado de Idaho, EUA, durante programa de vigilância para influenza em aves selvagens; dos 24 vírus isolados dessa espécie no período de 2007-2008, apenas um pertencia ao subtipo H8 (PEDERSEN; SWAFFORD; DELIBERTO, 2010). Na Europa, a prevalência encontrada para o subtipo H8 em aves selvagens migratórias foi de 1,8% e este subtipo foi isolado de apenas duas espécies: marrequinha-comum (*Anas crecca*) e pato-real (MUNSTER et al., 2007).

Nota-se que os relatos de infecção pelo subtipo H8 estão associados, principalmente, a Anseriformes e Charadriiformes, ordens estas reconhecidas como reservatórios do AIV na natureza (WEBSTER et al., 1992; MUNSTER; FOUCHIER, 2009). Além disso, outros subtipos para os quais se detectaram anticorpos em aves de subsistência neste trabalho com menor frequência, como H1, H4, H9, H10 e H12, também já foram identificados em anserídeos selvagens e em aves limícolas (KANG et al., 2010; PEDERSEN; SWAFFORD; DELIBERTO, 2010; BEVINS et al., 2014; LATORRE-MARGALEF et al., 2014). Anualmente, várias espécies destas ordens migram ao Hemisfério Sul e observou-se que aves recuperadas na costa brasileira, região Amazônica e Sudeste eram procedentes, em sua maioria, da América do Norte e Central, mas também da Europa (COSTA; SANDER, 2008; MESTRE; ROOS; NUNES, 2010). Sendo assim, a interação direta ou indireta das aves domésticas com as aves migratórias e/ou silvestres presentes nos sítios estudados poderia explicar a diversidade de diferentes subtipos do AIV para os quais foram detectados anticorpos na população de aves de subsistência.

Apesar de não terem sido detectadas aves domésticas positivas para os subtipos H5 e H7 do AIV neste trabalho, anticorpos para estes dois subtipos e também para H9 foram detectados em aves silvestres no estado de SP por Sousa et al. (2013). Das 31 aves testadas, 27 apresentaram anticorpos para um ou mais subtipos. Dentre as espécies investigadas e que apresentaram reatividade estão corujas, pombo, rolinha-roxa, sabiá, bem-te-vi, pica-pau, tucano-toco, seriema, savacu e alma-de-gato.

O papel dos Passeriformes, conhecidos como pássaros ou passarinhos, como reservatórios do AIV sob condições naturais é controverso. De um lado, os passeriformes foram elencados como reservatórios do AIV em estudo feito nos EUA por Fuller et al. (2010) em que vinte e duas espécies, incluindo pardais, foram

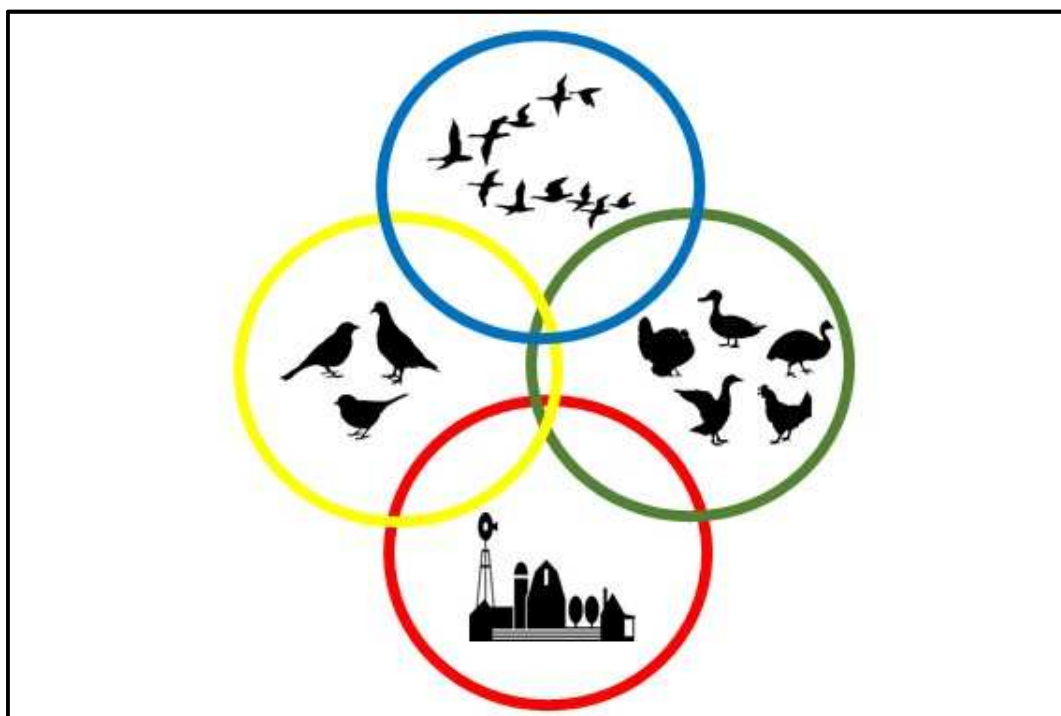
positivas para o AIV em ensaio de detecção molecular. Do outro, os resultados obtidos por Slusher et al. (2014) sugerem que as aves terrestres possam desempenhar um papel limitado na epidemiologia da influenza aviária, uma vez que dentre as 589 amostras, obtidas de 122 diferentes espécies, submetidas ao isolamento viral ou ao qPCR, nenhuma resultou positiva; e apenas quatro de 3868 amostras de soro apresentaram anticorpos para a NP do AIV por ELISA.

Sabe-se que os passeriformes e outras espécies de aves terrestres são susceptíveis à infecção por vírus influenza A (WEBSTER et al., 1992) e inclusive vírus HPAI H7N7 e H5N1 já foram isolados de estorninhos, pardais e pombas (NESTOROWICZ et al., 1987; ELLIS et al., 2004; POETRANTO et al., 2011). Considerando que algumas espécies de aves silvestres se alimentam, dormem e fazem ninhos próximo ou até mesmo dentro de locais onde aves domésticas são alojadas, é fácil perceber que existem muitas possibilidades de interação direta e indireta entre elas. Sendo assim, acredita-se que as aves silvestres terrestres possam desempenhar um importante papel na ecologia da influenza A e na transmissão do AIV a aves de subsistência, aves comerciais e até mesmo a humanos (CLARK; HALL, 2006; ARTOIS et al., 2009; MADSEN et al., 2013b). A Figura 6 tem o intuito de ilustrar as possibilidades de interação entre as diferentes populações de importância para este trabalho e o provável papel das mesmas na introdução da influenza aviária em sistemas comerciais de produção.

Como é possível observar no Quadro 9, algumas aves apresentaram anticorpos para mais de um subtipo do AIV. Esse resultado pode ser atribuído à interação das aves domésticas de subsistência com outras espécies de aves que possam estar infectadas por diferentes subtipos do AIV. Lamentavelmente, os relatos formais de detecção de aves domésticas com anticorpos para vários subtipos do AIV são inexistentes, mesmo porque muitas das ações de vigilância nessa população são voltadas apenas para a detecção de anticorpos para os subtipos H5 e H7 (EL-ZOGHBY et al., 2011; COUACY-HYMANN et al., 2012b; FERRER et al., 2013; WEGDAN; KHAIR; MANSOUR, 2015). Ainda que existam relatos da subtipificação de anticorpos com antígenos para diferentes hemaglutininas, estes não mencionam resultados de reatividade para mais de um subtipo (SENNE, 2003; DE WIT et al., 2004; PASICK et al., 2012; MARCHÉ et al., 2015). No entanto, a vigilância realizada em criações de fundo de quintal nos EUA evidencia a presença

de aves domésticas com anticorpos para mais de um subtipo do AIV (comunicação pessoal)¹. Ainda que as informações sobre possibilidade de coinfeção por diferentes subtipos de AIV em aves domésticas sejam escassas, relatos já foram feitos em aves selvagens. Anticorpos para os subtipos H5, H7 e H9 do AIV foram detectados simultaneamente em aves silvestres de diferentes espécies no Brasil (SOUSA et al., 2013) e em garças na China (WANG et al., 2014b). Além disso, coinfeções duplas e até triplas foram encontradas em patos selvagens de Alberta, Canadá (SHARP et al., 1997).

Figura 6 - Interação entre as diferentes populações de aves e sua contribuição para a introdução da influenza aviária em sistemas comerciais de produção



Fonte: (REISCHAK, D., 2016)

Legenda: Círculo azul: aves migratórias; Círculo amarelo: aves silvestres residentes; Círculo verde: aves de subsistência; Círculo vermelho: sistemas comerciais de produção de aves domésticas.

¹ Informação fornecida por Janice C. Pedersen, Microbiologista do NVSL/APHIS/USDA, durante treinamento realizado em 2013.

Um fator a ser também considerado na avaliação dos resultados encontrados ao teste de HI é a possibilidade de ocorrência de reação sorológica cruzada. Apesar de anticorpos dirigidos para HA serem subtipo específicos e, tipicamente, não reagirem com outros subtipos (LEE; SENNE; SUAREZ, 2006), a existência de reações cruzadas não deve ser descartada, principalmente para hemaglutininas que pertençam ao mesmo grupo antigênico. Os subtipos de hemaglutinina podem ser divididos em dois grupos antigenicamente distintos de acordo as relações filogenéticas baseadas na sequência de aminoácidos da proteína HA. O grupo 1 é composto pelos subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 e H16; já o grupo 2 é constituído pelos subtipos H3, H4, H7, H10, H14 e H15 (AIR, 1981; GAMBLIN; SKEHEL, 2010). Anticorpos produzidos em furões para o subtipo H3 do AIV, por exemplo, foram capazes de inibir a hemaglutinação de um vírus H7N9 de origem humana (H7N9 Anhui/1) em estudo de reatividade cruzada realizado na China (GUO et al., 2016). Adicionalmente, em pesquisa realizada por Guinn et al. (2016), anticorpos para os 16 subtipos de AIV foram pesquisados em gaiotas por microneutralização ou HI. Os autores identificaram maior frequência de anticorpos para as hemaglutininas pertencentes ao grupo 1 (H1, H5, H6, H9, H11, H13 e H16) e, apesar destes resultados sorológicos serem concordantes com os achados obtidos a partir do isolamento viral, não descartaram a possibilidade dos resultados encontrados no HI estarem associados a uma reação sorológica cruzada entre os subtipos.

Para interpretação dos resultados de HI aqui obtidos, também é preciso considerar a possibilidade de interferência cruzada por inibição estérica da neuraminidase. Esse tipo de fenômeno acontece quando a amostra de soro possui anticorpos para o mesmo subtipo de NA do antígeno utilizado, ou seja, uma amostra de soro positiva no teste de HI para um antígeno H5N2 pode se mostrar também positiva frente a um antígeno H8N2, mas não seria positiva se um antígeno H8N4 fosse empregado. Dessa forma, para prevenir a ocorrência de inibição estérica não específica, o ideal é que se disponha de um painel de antígenos com, pelo menos, duas diferentes combinações de HA-NA por subtipo ou que se utilizem antígenos recombinantes sem a fração NA (PEDERSEN, 2014; OIE, 2015). Dentre as amostras de soro que foram positivas para mais de um subtipo do AIV neste trabalho, em apenas quatro há possibilidade de ter havido inibição estérica: 21 e 22

(que foram positivas para os subtipos H6N2 e H9N2) e 33 e 48 (positivas para H1N1 e H10N1). Infelizmente, não se dispunha de antígenos H1, H6, H9 e H10 com outros subtipos de NA para a realização de uma subtipificação complementar. Além disso, não foi possível realizar a prova de inibição de neuraminidase para subtipificação da NA por não se dispor de volume de amostra suficiente para a realização deste ensaio.

Do total de amostras positivas no teste de cELISA para pesquisa de anticorpos para influenza A (n = 101), 79 foram submetidas à prova de HI para subtipificação da HA para a qual os anticorpos eram dirigidos. Destas, 27 não apresentaram anticorpos para quaisquer dos subtipos de HA.

Um ponto importante a considerar é que os testes aqui empregados detectam anticorpos para diferentes antígenos do AIV. Enquanto o cELISA utilizado detecta anticorpos para a nucleoproteína, o HI detecta anticorpos para HA. Apesar dos antígenos de superfície do AIV serem os únicos capazes de induzir a produção de anticorpos neutralizantes e, portanto, uma resposta imune protetora, resposta humoral também é montada para as proteínas internas, destacando-se aqui as proteínas NP e M. Ambas são importantíssimas quando utilizadas como antígenos em testes de diagnóstico pois, por serem altamente conservadas entre os diferentes subtipos do AIV, permitem a detecção de anticorpos para qualquer vírus influenza A (SUAREZ; SCHULTZ-CHERRY, 2000).

A aparente discordância observada entre os resultados obtidos no teste de cELISA AIV e de HI pode também ser atribuída a diferença de sensibilidade dos dois ensaios. Os testes convencionais, como o HI, podem não ter a mesma sensibilidade analítica do ELISA na detecção de amostras que apresentem baixos títulos de anticorpos (SHAFER; KATZ; EERNISSE, 1998).

Na avaliação de um *kit* comercial de cELISA para NP, em que foram utilizadas amostras de soro de aves inoculadas e vacinadas, os padrões gerais observados no título de anticorpos após desafio ou vacinação demonstraram que o cELISA foi mais sensível do que o HI, uma vez que foi capaz de detectar soroconversão em menor tempo (SONG et al., 2009). Além disso, em plantéis de galinhas sabidamente positivos para LPAI, o cELISA detectou mais aves positivas do que o HI.

Resultados similares foram obtidos por Starick et al. (2006) durante a avaliação de um cELISA para NP em que foram avaliadas amostras de soro de aves infectadas experimentalmente e de aves naturalmente infectadas. O cELISA não só detectou anticorpos em aves experimentalmente infectadas antes do HI, como identificou um número maior de animais positivos. Os autores relataram também a existência de cinco amostras de soros com resultados positivos no cELISA e negativos no HI, sendo que três delas resultaram positivas no HI algum tempo depois.

Sabe-se que o título de anticorpos na prova de HI é dependente da relação antigênica entre o isolado utilizado para produção do antígeno e os anticorpos específicos presentes na amostra de soro. Quando mutações antigênicas significativas ocorrem em um subtipo, a sensibilidade do ensaio de HI pode ser reduzida, pois haverá uma menor reatividade entre os anticorpos presentes na amostra e o antígeno utilizado na prova (SPACKMAN; SUAREZ; SENNE, 2008). Sendo assim, a utilização de antígenos que possam ser representativos das variações antigênicas eventualmente existentes dentro de um mesmo subtipo viral forneceria resultados mais acurados nos testes sorológicos (ESCORCIA et al., 2010). No entanto, a existência de um painel de antígenos que contemple toda essa diversidade requer uma vasta coleção de subtipos virais e um exaustivo trabalho laboratorial para produção e otimização dos reagentes (LEE; SENNE; SUAREZ, 2006; PEDERSEN, 2014). Na impossibilidade de se ter em mãos antígenos que representem a variedade antigênica regional, a utilização de reagentes produzidos com subtipos de referência é capaz de produzir resultados aceitáveis. Porém, não se pode descartar a possibilidade de que os anticorpos subtipo-específicos presentes em uma amostra possam, eventualmente, não reconhecer os epítomos dos antígenos empregados no teste.

Apesar de ensaios para pesquisa de anticorpos serem amplamente utilizados em programas de monitoria ativa para AI, a associação com provas de detecção de antígeno, como o qPCR, aumenta a sensibilidade do sistema de vigilância (COMIN et al., 2012).

No Brasil, a vigilância permanente realizada pelo MAPA para influenza aviária e doença de Newcastle contempla a colheita de amostras de soro e de suabes de cloaca e traqueia da maioria das populações monitoradas. Neste estudo, por

exemplo, pode-se perceber que apenas três aves de subsistência (galinhas de uma mesma exploração localizada no sítio da Foz do Rio Araranguá em SC) apresentaram resultados positivos ao qPCR AIV. Esta mesma propriedade apresentou resultados positivos no cELISA AIV (06/18) e anticorpos para os subtipos H6 e H8 foram encontrados em quatro das aves positivas no cELISA AIV. Apesar da tentativa de isolamento viral ter sido feita, não foi possível isolar qualquer agente hemaglutinante após duas passagens consecutivas em ovos embrionados de galinhas SPF.

Considerando os resultados obtidos nos diferentes ensaios para este caso especificamente, fica evidente que havia circulação de AIV naquela exploração. No entanto, os demais resultados obtidos ao teste de qPCR AIV, todos negativos, corroboram para a necessidade de associação de ensaios sorológicos e virológicos para aumentar a sensibilidade do sistema.

A influenza aviária notificável à OIE, ou seja, aquela causada pelos subtipos H5 e H7 é, até o presente momento, exótica no Brasil, uma vez que estes subtipos não foram diagnosticados por métodos diretos ou indiretos.

O presente estudo corrobora esta situação epidemiológica, sinalizando, entretanto, que subtipos de AIV de baixa patogenicidade circulam em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias.

A baixa frequência de positividade do qPCR AIV (0,106%), no entanto, chama a atenção e abre espaço para discussão sobre a aplicabilidade dos ensaios moleculares para detecção de antígeno em estudos congêneres.

Ainda que o qPCR AIV possua alta sensibilidade e especificidade e detecte vírus viáveis e inativados, o RNA alvo precisa estar presente nas amostras de fezes no momento de sua colheita. Não obstante o fato da quantidade de excreção do AIV ser dependente da espécie, do estado imune do hospedeiro e da estirpe viral envolvida (CATTOLI; MONNE, 2010), de forma geral, a maioria das aves infectadas excretam o AIV por um período de apenas sete a dez dias (SWAYNE, 2008).

Sendo assim, em atividades de vigilância ativa, o período de colheita das amostras pode nem sempre coincidir com o período de excreção do vírus, o que impacta diretamente a obtenção de resultados nesta prova.

O desempenho dos ensaios moleculares para detecção de ácidos nucleicos também é afetado pela qualidade das amostras colhidas. Se por um lado estes

ensaios possibilitam a detecção do RNA viral em amostras contendo partículas inativadas, por outro podem ter seu desempenho comprometido caso o RNA alvo esteja degradado (em virtude de condições inadequadas de manuseio ou transporte, por exemplo) ou a amostra contenha inibidores da reação de PCR (SCHRADER et al., 2012). Dessa forma, percebe-se que os materiais e meios de transporte utilizados para a colheita das amostras, assim como a temperatura de armazenamento das mesmas, são críticos para o sucesso da detecção laboratorial do AIV.

A utilização de suabes de algodão com haste de madeira para colheita de amostras é uma prática amplamente disseminada no meio veterinário, uma vez que este tipo de material é de fácil aquisição e baixo custo. No entanto, estes suabes podem ser tratados com substâncias que interferem nas reações de PCR e até mesmo no isolamento viral, tendo seu uso desaconselhado quando as amostras serão destinadas a essa finalidade (FAOAGALI, 2010). O Lanagro-SP, laboratório nacional de referência para o diagnóstico da influenza aviária e da doença de Newcastle, vem tentando, especialmente nos últimos anos, sensibilizar os veterinários que atuam na área de Defesa Sanitária Animal sobre a importância da colheita e remessa de material na qualidade dos ensaios laboratoriais. Notas técnicas elaboradas pelo Lanagro-SP e distribuídas ao SVO pelo DSA vem sendo redigidas com o intuito de recomendar aos veterinários de campo os materiais e meios de transporte mais indicados para a colheita de amostras, assim como os procedimentos a serem adotados para armazenamento e remessa do material ao laboratório. Dentre as recomendações está a indicação de uso de suabes de nylon flocado ou de poliéster, ambos com hastes plásticas, para colheita de amostras destinadas aos diagnósticos virológico e molecular da influenza aviária. Recomenda-se também a utilização de meios de transporte específicos (MEM, BHI ou TPB acrescidos de antibióticos) e que sejam mantidas condições adequadas de armazenamento do material a campo (a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ por até 96 h ou a -80°C por períodos maiores), bem como manutenção da cadeia de frio durante a remessa ao laboratório. Tais recomendações tem como base os resultados dos estudos realizados por Fereidouni et al. (2012) e Spackman et al. (2013) sobre os efeitos de diferentes tipos de suabes, meios de transporte e condições de armazenamento na qualidade da detecção do AIV por qPCR.

Apesar deste processo de sensibilização ser lento, muito já se avançou nesse sentido. No entanto, não se pode garantir até hoje que os materiais adequados vêm sendo utilizados a campo para a colheita do material, principalmente no que diz respeito ao tipo de suabe. Portanto, a ausência de detecção do AIV por qPCR neste trabalho pode ter sido influenciada pelo uso inadequado de material para as colheitas e/ou por condições impróprias de armazenamento das amostras. Tendo em vista que esse tipo de problema pode dar origem a resultados falso-negativos, prejudicando a sensibilidade dos programas de vigilância, é crucial que o SVO se adeque às recomendações feitas.

A ausência de resultados positivos no ensaio de qPCR também poderia ser atribuída a falhas no momento da execução do ensaio, tais como o manuseio inadequado do RNA extraído, o uso impróprio de reagentes, a utilização de consumíveis não estéreis ou não livres de RNAses ou a não utilização de controles de referência (CATTOLI; MONNE, 2009). Esta possibilidade, no entanto, é pequena, uma vez que todas as etapas do ensaio, assim como o uso de consumíveis, equipamentos e reagentes, além de treinamento do pessoal, estão muito bem definidos e atendem os requisitos da Norma ABNT ISO:IEC 17025:2005.

Considerando o grau de variabilidade genética dos vírus influenza A e as contínuas possibilidades de mutações antigênicas, a ausência de resultados positivos no qPCR AIV poderia também ser atribuída à utilização de *primers* e sondas “desatualizados” para a detecção dos vírus circulantes (TSENG; TSAI; CHANG, 2014). Tendo em vista que o *kit* comercial empregado para a reação de qPCR AIV tem como alvos genômicos regiões conservadas localizadas nos genes que codificam para as proteínas M e NP, reduzindo assim o risco de ocorrência de resultados falsos-negativos, esta possibilidade parece muito pouco provável.

Ainda que a detecção do AIV por qPCR tenha ocorrido em apenas três de 3163 reações (0,106%), a presença de anticorpos para diferentes subtipos do vírus influenza A indica que este está presente em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil. Apesar de não terem sido detectadas aves com anticorpos para os subtipos H5 e H7, aves com anticorpos para outros subtipos de interesse para a saúde humana e animal, como H6 e H9, foram identificadas.

O subtipo H9 do AIV foi relacionado a surtos de LPAI em aves domésticas de diversos países desde os anos 90, incluindo Alemanha, Itália, Irlanda, EUA, África do Sul e Coreia (ALEXANDER, 2007). No entanto, este subtipo passou a receber maior notoriedade após seu envolvimento em dois casos de influenza humana em Hong Kong em 1999. Naquela ocasião, o vírus responsável pelos casos humanos mostrou similaridade com um LPAIV H9N2 que havia sido isolado de codornas, também em Hong Kong, em 1997 (LIN et al., 2000). Na China, o subtipo H9N2 tem sido responsável por surtos em aves domésticas e por casos esporádicos em humanos desde 1994 e é considerado uma ameaça para a saúde pública (JIN et al., 2014).

Já o subtipo H6 do AIV, frequentemente relatado em aves aquáticas domésticas e silvestres, apesar de não estar relacionado a casos de HPAI, é reconhecido como um dos subtipos de influenza com capacidade para contribuir para o desenvolvimento de uma cepa com potencial pandêmico (WANG et al., 2014a). O primeiro relato de um caso humano de infecção por um vírus influenza A do subtipo H6 se deu em Taiwan em 2013, sendo que o vírus mostrou estreita similaridade com um isolado H6N1 de galinha detectado no mesmo ano (YUAN et al., 2013).

Ainda que se desconheça o risco que as aves de subsistência representem para os plantéis comerciais nas condições brasileiras, a partir dos resultados obtidos neste trabalho é preciso considerar seu papel como uma possível fonte de infecção aos seres humanos. As criações familiares se caracterizam pelo contato estreito e frequente entre animais e humanos, sendo permitido aos animais, muitas vezes, o livre acesso ao ambiente familiar. Neste tipo de criação, várias são as vias pelas quais os seres humanos podem se infectar, como o contato direto com sangue e fluidos corporais das aves durante atividades de abate, depenagem, remoção de vísceras, manuseio da carcaça, ingestão de carne e cuidado com as aves. Além disso, as pessoas também estão expostas à infecção por vias indiretas como limpeza das instalações, remoção de fezes, utilização dos dejetos como fertilizante e inalação, ingestão ou inoculação conjuntival ou oral de água contaminada com fezes, principalmente se fazem uso de águas superficiais, frequentadas por aves aquáticas domésticas ou silvestres, para banho ou recreação (RABINOWITZ; PERDUE; MUMFORD, 2010; VAN KERKHOVE et al., 2011).

Criações de fundo de quintal se caracterizam, tipicamente, por higiene deficiente, medidas pobres de biossegurança e um alto risco de doenças infecciosas (CONAN et al., 2012). As falhas de biossegurança mais comuns neste tipo de exploração são: mistura de aves de diferentes origens, ausência de quarentena, falta de restrição de acesso a visitantes, nenhuma precaução quanto a troca de sapatos, ausência de higienização das mãos antes ou após o manuseio dos animais, controle pobre de roedores e outras pragas e livre acesso de aves silvestres à criação (WHITEHEAD; ROBERTS, 2014). Em estudos realizados nos EUA e no Reino Unido, observou-se que a maioria dos proprietários de aves de subsistência não tem consciência sobre as enfermidades a que suas aves estão sujeitas e nem conhecimento sobre zoonoses (KARABOZHILOVA et al., 2012; ELKHORAIBI et al., 2014). Além disso, muitos criadores de aves de fundo de quintal relatam não procurar por assistência veterinária mesmo quando necessitam de informações ou possuem aves doentes na propriedade (WHITEHEAD; ROBERTS, 2014). Apesar destes relatos terem sido feitos em outros países, é perceptível que retratam também as condições das criações de subsistência existentes no Brasil.

De acordo com o Código Sanitário para Animais Terrestres da OIE (2016), biossegurança significa um conjunto de medidas físicas e de gestão desenhadas para reduzir o risco de introdução, estabelecimento e disseminação das enfermidades, infecções e infestações animais de, para e dentro de uma população animal. Desde os surtos de H5N1, o sistema industrial de produção avícola intensificou a adoção de medidas rigorosas de biossegurança a fim de reduzir o risco de introdução da influenza aviária no plantel nacional. No entanto, a adoção de tais medidas requer investimentos e nem sempre é possível adaptá-las à realidade econômica das criações de subsistência (CONAN et al., 2012). Ainda assim, com o intuito de salvaguardar a saúde humana e animal, os proprietários de aves de fundo de quintal deveriam ser orientados e incentivados a aplicar medidas básicas de biossegurança como evitar a mistura de aves de diferentes origens, não alimentar e evitar o acesso de aves silvestres em suas criações, proceder a limpeza e a desinfecção semanal das instalações e lavar as mãos antes e após manusear as aves.

Tendo em vista a importância socioeconômica, cultural e nutricional destas criações para comunidades de baixa renda (FREIRE et al., 2005; GUÈYE, 2005;

GONZALEZ-ORTÍZ et al., 2013) e a possibilidade das aves domésticas atuarem como fonte de infecção do AIV aos seres humanos (RABINOWITZ; PERDUE; MUMFORD, 2010; SULTANA et al., 2012), fica evidente que as atividades de vigilância em populações de fundo de quintal deveriam ser intensificadas e ampliadas, se estendendo, inclusive, a criações localizadas em áreas urbanas e periurbanas. Muito se especula sobre o risco que as criações de subsistência representam para o plantel avícola comercial, mas a verdade é que existem poucos estudos a respeito.

Em dois deles, pelo menos, se estima que a contribuição epidemiológica das aves de fundo de quintal para a introdução da AI nos plantéis comerciais é, no máximo, modesta (BAVINCK et al., 2009; SMITH; DUNIPACE, 2011). No entanto, deve-se salientar que estes estudos foram feitos a partir das realidades europeia e norte-americana. Na Tailândia, por exemplo, as explorações de fundo de quintal tiveram um importante papel na disseminação e persistência do HPAI H5N1 no surto de 2004, uma vez que 83% das criações afetadas eram de aves de subsistência (TIENSIN et al., 2005).

A crescente preocupação com os surtos de HPAI que vem ocorrendo pelo mundo, levou os governos de diversos países a incrementarem suas atividades de vigilância. No entanto, essas monitorias estão especialmente focadas nos plantéis avícolas comerciais, em mercados de aves vivas e em aves migratórias, permanecendo limitada a vigilância em aves de subsistência (MADSEN et al., 2013b). Mesmo no Brasil essa monitoria é limitada, uma vez que contempla apenas as aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias e o atendimento a ocasionais notificações de alta mortalidade.

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciam que as aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil estão expostas à infecção por subtipos de baixa patogenicidade do AIV, podendo servir como fonte de infecção a outras aves e aos seres humanos. Ainda que estas criações não possuam registro junto ao MAPA, não gerem divisas e sequer sejam consideradas unidades produtivas, elas desempenham um papel social importante, contribuindo para a fixação do homem à terra, para a melhoria da qualidade da dieta e para a complementação da renda de muitas famílias. Sendo assim, espera-se que estes resultados sensibilizem o SVO brasileiro sobre o papel das aves de

subsistência como sentinelas para a introdução da influenza aviária no país e sobre a necessidade de ampliação das atividades de vigilância para influenza aviária nesta população a fim de salvaguardar a saúde humana e animal.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- a) Empregando o cELISA AIV como teste de triagem foi possível detectar anticorpos para o AIV em 101 das 2816 amostras de soro de aves de subsistência criadas no entorno de aves migratórias no Brasil;
- b) Das 101 amostras cELISA AIV positivas, o teste de HI empregando os 16 tipos conhecidos de hemaglutininas foi capaz de detectar o tipo de hemaglutinina do AIV envolvido em 52 delas;
- c) Foram encontrados anticorpos inibidores da hemaglutinação para os subtipos H1, H3, H4, H6, H8, H9, H10, H12, H13 e H16 do AIV;
- d) Foi possível perceber uma predominância de aves positivas para os subtipos H3, H6, H8 e H13 do AIV, sendo que a frequência das amostras positivas para cada um destes subtipos parece estar relacionada à localização geográfica dos sítios;
- e) Os resultados da pesquisa de anticorpos pela prova de HI indicam não haver circulação dos subtipos notificáveis H5 e H7 do AIV na população de aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil;
- f) A pesquisa de RNA do AIV em suabes cloacais por qPCR AIV detectou apenas 3 amostras positivas, as quais foram negativas ao qPCR H5 e qPCR H7 que detectam os subtipos H5 e H7 do AIV;
- g) Dadas as evidências de circulação do AIV em aves de subsistência criadas no entorno de sítios de aves migratórias no Brasil, outros estudos são necessários para esclarecer o papel desses animais na epidemiologia da influenza aviária nas populações humana e animal.

REFERÊNCIAS

- ABDELWHAB, E.-S. M.; VEITS, J.; METTENLEITER, T. C. Genetic changes that accompanied shifts of low pathogenic avian influenza viruses toward higher pathogenicity in poultry. **Virulence**, v. 4, n. 6, p. 441–52, 2013.
- ADAIR, B. M.; TODD, D.; MCKILLOP, E. R.; MCNULTY, M. S. Detection of influenza a type-specific antibodies in chicken and turkey sera by enzyme linked immunosorbent assay. **Avian Pathology**, v. 18, n. 3, p. 455–463, 1989.
- AGUERO, M.; MIGUEL, E. S.; SANCHEZ, A.; GOMEZ-TEJEDOR, C.; JIMENEZ-CLAVERO, M. A. A fully automated procedure for the high-throughput detection of avian influenza virus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 235–241, 2007.
- AIR, G. M. Sequence relationships among the hemagglutinin genes of 12 subtypes of influenza A virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7639–43, 1981.
- ALDERS, R. Producción avícola por beneficio y por placer. **Folleto de la FAO**, v. 3, p. 29, 2005.
- ALEXANDER, D. J. A review of avian influenza in different bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 3-13, 2000.
- ALEXANDER, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5637–5644, 2007.
- ALEXANDER, D. J.; BROWN, I. H. History of highly pathogenic avian influenza. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 28, n. 1, p. 19–38, 2009.
- ALEXANDER, D.J.; CAPUA, I.; KOCH, G. Highly pathogenic avian influenza outbreaks in Europe, Asia, and Africa since 1959, excluding the Asian H5N1 virus outbreaks In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian Influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. p. 217-237.
- ALL ABOUT THE BIRDS. Whimbrel. Disponível em: <<https://www.allaboutbirds.org/guide/Whimbrel/lifehistory>>. Acesso em: 20 jun. 2016.
- ALVAREZ, P.; MATTIELLO, R.; RIVAILLER, P.; PEREDA, A.; DAVIS, C. T.; BOADO, L.; D'AMBROSIO, E.; AGUIRRE, S.; ESPINOSA, C.; LA TORRE, J.; DONIS, R.; MATTION, N. First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina. **Virology**, v. 396, n. 1, p. 76–84, 2010.
- ALY, M M; ARAFA, A; HASSAN, M. K. Epidemiological findings of outbreaks of disease caused by highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in poultry in Egypt

during 2006. **Avian Diseases**, v. 52, n. 2, p. 269–77, 2008.

ARAÚJO, F. A. A.; VIANNA, R. D. S. T.; ANDRADE FILHO, G. V. de; MELHADO, D. L.; TODESCHINI, B.; CAVALCANTE, G. C. E.; FEDRIZZI, C. E.; MAGALHÃES, V. S.; SCHERER, A.; ALMEIDA, M. A. B. De; PORTELLA, A. de S.; SANTOS, E. dos; SCHERER, S. B.; DORETTO, L.; MARTINS, L. C.; RODRIGUES, S. G.; VASCONCELOS, P. F. da C. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus da Febre do Nilo Ocidental e outros vírus. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. Ano 4, n. 2, p. 1–8, 2004.

ARTOIS, M.; BICOUT, D.; DOCTRINAL, D.; FOUCHIER, R.; GAVIER-WIDEN, D.; GLOBIG, a; HAGEMEIJER, W.; MUNDKUR, T.; MUNSTER, V.; OLSEN, B. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe: the risks associated with wild birds. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 28, n. 1, p. 69–92, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). **Relatório Anual**. 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BARBIERI, E. Variação temporal do Trinta-réis-de-bico-amarelo (*Thalasseus sandvicensis eurygnatha*) durante o ano de 2005 no estuário de Cananéia-Iguape-Ilha Comprida. **Ornitologia Neotropical**, v. 8, n. 2, p. 97–102, 2008.

BARBIERI, E.; PAES, E. T. The birds at Ilha Comprida beach (São Paulo state, Brazil): a multivariate approach. **Biota Neotropica**, v. 8, n. 3, p. 41–50, 2008.

BAVINCK, V.; BOUMA, A.; VAN BOVEN, M.; BOS, M. E. H.; STASSEN, E.; STEGEMAN, J. A. The role of backyard poultry flocks in the epidemic of highly pathogenic avian influenza virus (H7N7) in the Netherlands in 2003. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 88, n. 4, p. 247–254, 2009.

BEARD, C. W. Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 42, n. 5, p. 779–785, 1970.

BENCKE, G. A.; DIAS, R. A.; BUGONI, L.; AGNE, C. E.; FONTANA, C. S.; MAURÍCIO, G. N.; MACHADO, D. B. Revisão e atualização da lista das aves do Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 100, n. 4, p. 519–556, 2010.

BEVINS, S. N.; PEDERSEN, K.; LUTMAN, M. W.; BAROCH, J. A.; SCHMIT, B. S.; KOHLER, D.; GIDLEWSKI, T.; NOLTE, D. L.; SWAFFORD, S. R.; DELIBERTO, T. J. Large-scale avian influenza surveillance in wild birds throughout the United States. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. 1–8, 2014.

BIRDLIFE INTERNATIONAL, Species factsheet: *Larus dominicanus*. Disponível em:< <http://www.birdlife.org/datazone/species/factsheet/22694329>>. Acesso em: 20

jun.2016.

BISHAI, F. R.; GALLI, R. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 8, n. 6, p. 648–656, 1978.

BISWAS, P. K.; CHRISTENSEN, J. P.; AHMED, S. S. U.; DAS, A.; RAHMAN, M. H.; BARUA, H.; GIASUDDIN, M.; HANNAN, A. S. M. A.; HABIB, M. A.; DEBNATH, N. C. Risk for infection with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in backyard chickens, Bangladesh. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1931–1936, 2009.

BOERE, G.; STROUD, D. The flyway concept: what it is and what it isn't. **Waterbirds Around the World**, p. 40–47, 2006.

BRASIL. **Grupo Executivo Interministerial para Implantação do Plano Brasileiro de Preparação para uma Pandemia de Influenza. Plano de prevenção à influenza aviária em aves silvestres e de subsistência**. Brasília, DF, 2006. 45 p. Disponível em:<
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20avicola/procedimentos%20para%20atendimento.pdf. Acesso em: 20 jun. 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria n.193 de 19 de setembro de 1994. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 set. 1994, Seção 1, p. 14309.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 32 de 13 de maio de 2002. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 14 mai. 2002, Seção 1, p. 28.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 11 de 1º de setembro de 2003. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 set. 2003, Seção 1, p. 3.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 56 de 4 de dezembro de 2007. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 6 dez. 2007, Seção 1, p. 11.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução normativa n. 50 de 24 de setembro de 2013. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 set. 2013, Seção 1, p. 47.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle**. Brasília: MAPA, 2013. 59 p. Disponível em: <
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/PNSA/Plano%20de%20Conting%C3%Aancia%20-%20Vers%C3%A3o%201_4.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

BROWN, I. H. Summary of avian influenza activity in Europe, Asia, and Africa, 2006-2009. **Avian Diseases**, v. 54, p. 187–193, 2010.

BROWN, J. D.; LUTTRELL, M. P.; BERGHAUS, R. D.; KISTLER, W.; KEELER, S. P.; HOWEY, A.; WILCOX, B.; HALL, J.; NILES, L.; DEY, A.; KNUTSEN, G.; FRITZ, K.; STALLKNECHT, D. E. Prevalence of antibodies to type A influenza virus in wild avian species using two serologic assays. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 896–911, 2010.

BUSCAGLIA, C.; ESPINOSA, C.; TERRERA, M. V.; DE, B. R. Avian influenza surveillance in backyard poultry of Argentina. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 467–469, 2007. Supplement.

CAMILLO, S.C.A.; REISCHAK, D.; DOMINGUES, C.S.; ORSI, M.A.; PEDERSEN, J.C. Micro-neuraminidase inhibition assay for subtype identification of avian influenza virus isolated from migratory birds in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v. 16, n.1, p. 72, 2011. Supplement.

CARVALHO, D. L. de; RODRIGUES, A. A. F. Spatial and temporal distribution of migrant shorebirds (Charadriiformes) on Caranguejos Island in the Gulf of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 19, n. 4, p. 486–492, 2011.

CATTOLI, G.; MONNE, I. Avian influenza virus. In: LIU, D. L. (Ed.). **Molecular Detection of Foodborne Pathogens**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2009. p. 49–62.

CHARLTON, B.; CROSSLEY, B.; HIETALA, S. Conventional and future diagnostics for avian influenza. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 4, p. 341–350, 2009.

CHUA, T.-H.; ELLIS, T. M.; WONG, C. W.; GUAN, Y.; GE, S. X.; PENG, G.; LAMICHHANE, C.; MALIADIS, C.; TAN, S.; SELLECK, P.; PARKINSON, J.; TZE-HOONG, C.; ELLIS, T. M.; WONG, C. W.; GUAN, Y.; GE, S. X.; PENG, G.; LAMICHHANE, C.; MALIADIS, C.; SZE-WEE, T.; SELLECK, P.; PARKINSON, J. Performance evaluation of five detection tests for avian influenza antigen with various avian samples. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 96–105, 2007.

CLARK, L.; HALL, J. Avian influenza in wild birds: status as reservoirs, and risks to humans and agriculture. **Ornithological Monographs**, v. 60, p. 3–29, 2006.

COMIN, A.; STEGEMAN, A.; MARANGON, S.; KLINKENBERG, D. Evaluating surveillance strategies for the early detection of low pathogenicity avian influenza infections. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–8, 2012.

COMIN, A.; TOFT, N.; STEGEMAN, A.; KLINKENBERG, D.; MARANGON, S. Serological diagnosis of avian influenza in poultry: Is the haemagglutination inhibition test really the “gold standard”? **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 7, n. 3, p. 257–264, 2013.

CONAN, A.; GOUTARD, F. L.; SORN, S.; VONG, S. Biosecurity measures for

backyard poultry in developing countries: a systematic review. **BMC veterinary research**, v. 8, n. 1, p. 240, 2012.

COSTA, E. S.; SANDER, M. Variação sazonal de aves costeiras (charadriiformes e ciconiiformes) no litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Biodiversidade Pampeana**, v. 6, n. 1, p. 3–8, 2008.

COUACY-HYMAN, E.; KOUAKOU, A. V.; KOUAMÉ, C. K.; KOUASSI, A. L.; KOFFI, Y. M.; GODJI, P.; NANA, P.; TARNAGDA, Z.; AKOUA-KOFFI, C. Surveillance for avian influenza and Newcastle disease in backyard poultry flocks in Côte d'Ivoire, 2007-2009. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 31, n. 3, p. 821–8, 2012a.

COUACY-HYMAN, E.; KOUAKOU, V. A.; APLOGAN, G. L.; AWOUME, F.; KOUAKOU, C. K.; KAKPO, L.; SHARP, B. R.; MCCLENAGHAN, L.; MCKENZIE, P.; WEBSTER, R. G.; WEBBY, R. J.; DUCATEZ, M. F. Surveillance for influenza viruses in poultry and swine, West Africa, 2006-2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p. 1446–1452, 2012b.

CRUZ, F.G.G.; CHAGAS, E.O.; BOTELHO, T. R. P. Avicultura familiar como alternativa de desenvolvimento sustentável em comunidades ribeirinhas do Amazonas. **Interações**, v. 14, n. 2, p. 197–202, 2013.

DE BOER, G. F.; BACK, W.; OSTERHAUS, A. D. M. E. An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. **Archives of Virology**, v. 115, n. 1-2, p. 47–61, 1990.

DE WIT, J. J.; KOCH, G.; FABRI, T. H. F.; ELBERS, A. R. W. A cross-sectional serological survey of the Dutch commercial poultry population for the presence of low pathogenic avian influenza virus infections. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 565–70, 2004.

DELIA, S.; RUSSO, V.; VULLO, V.; ACETI, A.; FERONE, U. Determination of specific antibodies to influenza A by ELISA. **The Lancet**, v. 1, n. 8026, p. 1364, 1977.

EL ZOWALATY, M. E.; ABIN, M.; RAJU, S.; CHANDER, Y.; REDIG, P. T.; ABD EL LATIF, H. K.; EL SAYED, M. A.; GOYAL, S. M. Isolation of avian influenza virus from polymerase chain reaction-negative cloacal samples of waterfowl. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, n. 1, p. 87–90, 2011.

ELKHORAIBI, C.; BLATCHFORD, R. A.; PITESKY, M. E.; MENCH, J. A. Backyard chickens in the United States: a survey of flock owners. **Poultry Science**, v. 93, n. 11, p. 2920–31, 2014.

ELLIS, T. M.; BOUSFIELD, R. B.; BISSETT, L. A.; DYRTING, K. C.; LUK, G. S. M.; TSIM, S. T.; STURM-RAMIREZ, K.; WEBSTER, R. G.; GUAN, Y.; MALIK PEIRIS, J. S. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. **Avian Pathology**, v. 33, n. 5, p. 492–505,

2004.

EL-ZOGHBY, E. F.; ABDELWHAB, E. M.; ARAFA, A.; SELIM, A. A.; KHOLOUSY, S. G.; KILANY, W. H.; HASSAN, M. K.; EL-KANAWATI, Z.; ALY, M. M.; HAFEZ, H. M. Active surveillance of avian influenza virus in backyard birds in Egypt. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 20, n. 4, p. 584–588, 2011.

ESCORCIA, M.; CARRILLO-SÁNCHEZ, K.; MARCH-MIFSUT, S.; CHAPA, J.; LUCIO, E.; NAVA, G. M. Impact of antigenic and genetic drift on the serologic surveillance of H5N2 avian influenza viruses. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 57, p. 2–7, 2010.

FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Wild birds and avian influenza - an introduction to applied field research and disease sampling techniques**. Rome. FAO, 2007. 115 p.

FAOAGALI, J. “Swabs” then and now: cotton to flocked nylon. **Microbiology Australia**, v. 31, n. 3, p. 133–136, 2010.

FEREIDOUNI, S. R.; GLOBIG, A.; STARICK, E.; HARDER, T. C.; GLOBIG, A. A. Effect of swab matrix, storage time, and temperature on detection of avian influenza virus RNA in swab samples. **Avian Diseases**, v. 56, n. 4, p. 955–958, 2012.

FERRER, E.; CALISTRI, P.; FONSECA, O.; IPPOLITI, C.; ALFONSO, P.; IANNETTI, S.; ABELEDO, M. A.; FERNÁNDEZ, O.; PERCEDO, M. I.; PÉREZ, A. Estimation of the sensitivity of the surveillance system for avian influenza in the western region of Cuba. **Veterinaria Italiana**, v. 49, n. 1, p. 99–107, 2013.

FOUCHIER, R. A. M.; MUNSTER, V. J. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 28, n. 1, p. 49–58, 2009.

FOUCHIER, R. A. M.; MUNSTER, V.; WALLENSTEN, A.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; SMITH, D.; GUUS, F.; OLSEN, B.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; RIMMELZWAAN, G. F. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls †. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2814–2822, 2005.

FOUCHIER, R. A. M.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; BROWN, I. H. Animal influenza virus surveillance. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1754–1757, 2003.

FREIRE, A.G.; MELO, M.N.; SILVA, F.S.S.; SILVA, E. En el « alrededor de casa », los animales del traspatio. **LEISA Revista de Agroecología**, v. 21, n. 3, p. 8–10, 2005.

FULLER, T. L.; SAATCHI, S. S.; CURD, E. E.; TOFFELMIER, E.; THOMASSEN, H. A.; BUERMANN, W.; DESANTE, D. F.; NOTT, M. P.; SARACCO, J. F.; RALPH, C. J.; ALEXANDER, J. D.; POLLINGER, J. P.; SMITH, T. B. Mapping the risk of avian

influenza in wild birds in the US. **BMC Infectious Diseases**, v. 10, p. 187, 2010.

GAGLIARDO, A. Forty years of olfactory navigation in birds. **The Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 12, p. 2165–71, 2013.

GAMBLIN, S. J.; SKEHEL, J. J. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 37, p. 28403–28409, 2010.

GAUTHIER-CLERC, M.; LEBARBENCHON, C.; THOMAS, F. Recent expansion of highly pathogenic avian influenza H5N1 : a critical review. **Ibis**, v. 149, p. 202–214, 2007.

GHERSI, B. M.; BLAZES, D. L.; ICOCHEA, E.; GONZALEZ, R. I.; KOCHER, T.; TINOCO, Y.; SOVERO, M. M.; LINDSTROM, S.; SHU, B.; KLIMOV, A.; GONZALEZ, A. E.; MONTGOMERY, J. M. Avian influenza in wild birds, central coast of Peru. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 935–938, 2009.

GHIZONI-JR, I. R.; AZEVEDO, M. A. G. de. Registros de algumas aves raras ou com distribuição pouco conhecida em Santa Catarina, sul do Brasil, e relatos de três novas espécies para o Estado. **Atualidades Ornitológicas**, v. 154, p. 33–46, 2010.

GIACCARDI, M.; YORIO, P.; LIZURUME, M. E. Patrones estacionales de abundancia de la gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) en un basural patagónico y sus relaciones con el manejo de residuos urbanos y pesqueros. **Ornitología Neotropical**, v. 8, p. 77–84, 1997.

GONZALEZ-ORTÍZ, F.; PÉREZ-MAGAÑA, A.; OCAMPO-FLETES, I.; PAREDES-SÁNCHEZ, J. A.; DELAROSA-PEÑALOSA, P. Contribuciones de la producción en traspatio a los grupos domésticos campesinos. **Estudios Sociales**, v. 22, n. 44, p. 146–170, 2013.

GUÈYE, E. F. Gender issues in family poultry production systems in low-income food-deficit countries. **World's Poultry Science Journal**, v. 61, p. 39–46, 2005.

GUINN, K.; FOJTIK, A. A.; DAVIS-FIELDS, A. N.; POULSON, A. R. L.; KRAUSS, A. S.; WEBSTER, B. R. G.; AC, D. E. S. Antibodies to influenza A viruses in gulls at Delaware Bay, USA. **Avian Diseases**, v. 60, n. 1, p. 341–345, 2016. Supplement.

GUO, L.; WANG, D.; ZHOU, H.; WU, C.; GAO, X.; XIAO, Y.; REN, L.; PARANHOS-BACCALÀ, G.; SHU, Y.; JIN, Q.; WANG, J. Cross-reactivity between avian influenza A (H7N9) virus and divergent H7 subtypic- and heterosubtypic influenza A viruses. **Scientific Reports**, v. 6, n. 22045, p. 1–8, 2016.

GUTIÉRREZ-RUIZ, E.J.; ARANDA-CICEROL, F.J.; RODRÍGUEZ-VIVAS, R.I.; BOLIO-GONZÁLEZ, M.E.; RAMÍREZ-GONZÁLEZ, S.; ESTRELLA-TEC, J. Bioagrocencias Sistemas de Producción. **Bioagrocencias**, v. 5, n. 1, p. 20–28, 2012.

- HADIPOUR, MOHAMMAD MEHDI; HABIBI, GHOLAMHOSSEIN; VOSOUGUI, A. Prevalence of antibodies to H9N2 avian influenza virus in backyard chickens around Maharlou Lake in Iran. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 31, n. 3, p. 192–194, 2011.
- HADIPOUR, M. M. Seroprevalence survey of H9N2 avian influenza virus in backyard chickens around the Caspian Sea in Iran. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 12, n. 1, p. 53–55, 2010.
- HAMMOND, G.W.; SMITH, S.J.; NOBLE, G. R. Sensitivity and specificity of enzyme immunoassay for serodiagnosis of influenza A virus infections. **Journal of Infectious Diseases**, v. 141, n. 5, p. 644–651, 1980.
- HESTERBERG, U.; HARRIS, K.; STROUD, D.; GUBERTI., V.; BUSANI, L.; PITTMAN, M.; PIAZZA, V.; COOK, A.; BROWN, I. Avian influenza surveillance in wild birds in the European Union in 2006. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2009.
- HILL, N. J.; TAKEKAWA, J. Y.; CARDONA, C. J.; MEIXELL, B. W.; ACKERMAN, J. T.; RUNSTADLER, J. A.; BOYCE, W. M. Cross-seasonal patterns of avian influenza virus in breeding and wintering migratory birds: a flyway perspective. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 3, p. 243–53, 2012.
- HIRST, G. K. The quantitative determination of influenza virus and antibodies by means of red cell agglutination. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 75, n. 1, p. 49–64, 1942.
- HOFFMANN, B.; BEER, M.; REID, S. M.; MERTENS, P.; OURA, C. A. L.; VAN RIJN, P. A.; SLOMKA, M. J.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; KING, D. P. A review of RT-PCR technologies used in veterinary virology and disease control: sensitive and specific diagnosis of five livestock diseases notifiable to the World Organisation for Animal Health. **Veterinary Microbiology**, v. 139, n. 1-2, p. 1–23, 2009.
- HULSE-POST, D. J.; STURM-RAMIREZ, K. M.; HUMBERD, J.; SEILER, P.; GOVORKOVA, E. A.; KRAUSS, S.; SCHOLTISSEK, C.; PUTHAVATHANA, P.; BURANATHAI, C.; NGUYEN, T. D.; LONG, H. T.; NAIPOSPOS, T. S. P.; CHEN, H.; ELLIS, T. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M.; WEBSTER, R. G. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 30, p. 10682–7, 2005.
- INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMCBIO). Relatório anual de rotas e áreas de concentração de aves migratórias no Brasil. CEMAVE/ICMBio, 2016. p. 87.
- INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES (ICTV). **Virus taxonomy**. 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

- IP, H. S.; TORCHETTI, M. K.; CRESPO, R.; KOHRS, P.; DEBRUYN, P.; MANSFIELD, K. G.; BASZLER, T.; BADCOE, L.; BODENSTEIN, B.; SHEARN-BOCHSLER, V.; KILLIAN, M. L.; PEDERSEN, J. C.; HINES, N.; GIDLEWSKI, T.; DELIBERTO, T.; SLEEMAN, J. M. Novel eurasian highly pathogenic avian influenza A H5 viruses in wild birds, Washington, USA, 2014. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 886–890, 2015.
- IQBAL, M. Controlling avian influenza infections: the challenge of the backyard poultry. **Journal of Molecular and Genetic Medicine**, v. 3, n. 1, p. 119–120, 2009.
- JEONG, J.; KANG, H. M.; LEE, E. K.; SONG, B. M.; KWON, Y. K.; KIM, H. R.; CHOI, K. S.; KIM, J. Y.; LEE, H. J.; MOON, O. K.; JEONG, W.; CHOI, J.; BAEK, J. H.; JOO, Y. S.; PARK, Y. H.; LEE, H. S.; LEE, Y. J. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N8) in domestic poultry and its relationship with migratory birds in South Korea during 2014. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 3-4, p. 249–257, 2014.
- JIN, Y.; YU, D. . D.; REN, H. H. .; YIN, Z. . Z.; HUANG, Z. . Z.; HU, M. . M.; LI, B. . B.; ZHOU, W. . W.; YUE, J. J. .; LIANG, L. . L. Phylogeography of avian influenza A H9N2 in China. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1110, p. 1–10, 2014.
- JOANNIS, T. M.; MESEKO, C. A.; OLADOKUN, A. T.; ULARAMU, H. G.; EGBUJI, A. N.; SOLOMON, P.; NYAM, D. C.; GADO, D. A.; LUKA, P.; OGEDENGBE, M. E.; YAKUBU, M. B.; TYEM, A. D.; AKINYEDE, O.; SHITTU, A. I.; SULAIMAN, L. K.; OWOLODUN, O. A.; OLAWUYI, A. K.; OBISHAKIN, E. T.; FASINA, F. O. Serologic and virologic surveillance of avian influenza in Nigeria, 2006-7. **Euro surveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles**, v. 13, n. 42, p. 1–5, 2008.
- KALETA, E. F.; RÜLKE, C. P. A. The beginning and spread of fowl plague (H7 High Pathogenicity Avian Influenza) across Europe and Asia (1878-1955). In: SWAYNE, D. E. (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. p. 145-189.
- KANG, H. M.; JEONG, O. M.; KIM, M. C.; KWON, J. S.; PAEK, M. R.; CHOI, J. G.; LEE, E. K.; KIM, Y. J.; KWON, J. H.; LEE, Y. J. Surveillance of avian influenza virus in wild bird fecal samples from South Korea, 2003-2008. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 878–888, 2010.
- KAPOOR, S.; DHAMA, K. Properties of influenza viruses. In: **Insight into Influenza Viruses of Animals and Humans**. Suíça: Springer International Publishing, 2014. p. 7–13.
- KARABOZHILOVA, I.; WIELAND, B.; ALONSO, S.; SALONEN, L.; HÄSLER, B. Backyard chicken keeping in the Greater London Urban Area: welfare status, biosecurity and disease control issues. **British Poultry Science**, v. 53, n. 4, p. 421–30, 2012.
- KAWAOKA, Y.; CHAMBERS, T. M.; SLADEN, W. L.; GWEBSTER, R. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? **Virology**, v. 163, n. 1, p. 247–250, 1988.

KHAN, M. S. I.; AKBAR, S. M. F.; HOSSAIN, S. T.; MAHATAB, M.; HOSSAIN, M. M.; IDRUS, Z. Possible route of transmission of highly pathogenic avian influenza virus type H5N1 in family poultry at rural Bangladesh. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 32, n. 1, p. 112–116, 2012.

KILPATRICK, A. M.; CHMURA, A. A.; GIBBONS, D. W.; FLEISCHER, R. C.; MARRA, P. P.; DASZAK, P. Predicting the global spread of H5N1 avian influenza. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 51, p. 19368–19373, 2006.

KIM, H.-R.; LEE, Y.-J.; PARK, C.-K.; OEM, J.-K.; LEE, O.-S.; KANG, H.-M.; CHOI, J.-G.; BAE, Y.-C. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) outbreaks in wild birds and poultry, South Korea. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 3, p. 480–3, 2012.

KIM, J. K.; NEGOVETICH, N. J.; FORREST, H. L.; WEBSTER, R. G. Ducks: The “Trojan Horses” of H5N1 influenza. **Influenza and other Respiratory Viruses**, v. 3, n. 4, p. 121–128, 2009.

KIRBY, J. S.; STATTERSFIELD, A. J.; BUTCHART, S. H. M.; EVANS, M. I.; GRIMMETT, R. F. A.; JONES, V. R.; O’SULLIVAN, J.; TUCKER, G. M.; NEWTON, I. Key conservation issues for migratory land- and waterbird species on the world’s major flyways. **Bird Conservation International**, v. 18, p. S49–S73, 2008.

KISTLER, W. M.; STALLKNECHT, D. E.; DELIBERTO, T. J.; VAN WHY, K.; YABSLEY, M. J. Subtype-specific influenza A virus antibodies in Canada geese (*Branta canadensis*). **Veterinary Microbiology**, p. 1–6, 2015.

KOCH, G.; ELBERS, A. R. W. Outdoor ranging of poultry: a major risk factor for the introduction and development of High-Pathogenicity Avian Influenza. **NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences**, v. 54, n. 2, p. 179–194, 2006.

KRAUSS, S.; WALKER, D.; PRYOR, S. P.; NILES, L.; CHENGHONG, L.; HINSHAW, V. S.; WEBSTER, R. G. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 4, n. 3, p. 177–189, 2004.

LAMBRE, C.; KASTURI, K. N. A microplate immunoenzyme assay for anti-influenza antibodies. **Journal of Immunological Methods**, v. 26, p. 61–67, 1979.

LARRAZÁBAL, M. E.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M.; PENA, O. Monitoramento de aves limícolas na Salina Diamante Branco, Galinhos, Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, n. 4, p. 1081–1089, 2002.

LATORRE-MARGALEF, N.; TOLF, C.; GROSOBOIS, V.; AVRIL, A.; BENGTSSON, D.; WILLE, M.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FOUCHIER, R. A. M.; OLSEN, B.; WALDENSTRÖM, J. Long-term variation in influenza A virus prevalence and subtype diversity in migratory mallards in northern Europe. **Proceedings of The Royal Society B**, v. 281, n. 1781, p. 20140098, 2014.

LEAL, S.; SERAPIÃO, L. C. H.; ALVES PEREIRA, G. Registros documentados da

Gaivota-de-Franklin *Leucophaeus pipixcan* (Wagler, 1831) no Nordeste do Brasil e da gaivota-de-cabeça-cinza *Chroicocephalus cirrocephalus* (Vieillot, 1817) nos Estados de Alagoas e Pernambuco. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 21, n. 1, p. 105–108, 2013.

LEE, C.; SENNE, D. A.; SUAREZ, D. L. Development and application of reference antisera against 15 hemagglutinin subtypes of influenza virus by DNA vaccination of chickens. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 13, n. 3, p. 395–402, 2006.

LEINIKKI, P.; PÄSSILÄ, S. Solid phase antibody assay by means of enzyme conjugated to anti-immunoglobulin. **Journal of clinical pathology**, v. 29, n. 12, p. 1116–20, 1976.

LIN, Y. P.; SHAW, M.; GREGORY, V.; CAMERON, K.; LIM, W.; KLIMOV, A.; SUBBARAO, K.; GUAN, Y.; KRAUSS, S.; SHORTRIDGE, K.; WEBSTER, R.; COX, N.; HAY, A. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9654–9658, 2000.

MACHALABA, C. C.; ELWOOD, S. E.; FORCELLA, S.; SMITH, K. M.; HAMILTON, K.; JEBARA, K. B.; SWAYNE, D. E.; WEBBY, R. J.; MUMFORD, E.; MAZET, J. A. K.; GAIDET, N.; DASZAK, P.; KARESH, W. B. Global avian influenza surveillance in wild birds: a strategy to capture viral diversity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 4, p. e1–e7, 2015.

MADSEN, J. M. J.; ZIMMERMANN, N. G. N.; TIMMONS, J.; TABLANTE, N. L. Evaluation of Maryland backyard flocks and biosecurity practices. **Avian diseases**, v. 57, n. 2, p. 233–7, 2013a.

MADSEN, J. M.; ZIMMERMANN, N. G.; TIMMONS, J.; TABLANTE, N. L. Avian influenza seroprevalence and biosecurity risk factors in Maryland backyard poultry: a cross-sectional study. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 1–8, 2013b.

MARCHÉ, S.; HOUDART, P.; VAN DEN BERG, T.; LAMBRECHT, B. Multiyear serological surveillance of notifiable influenza A viruses in Belgian poultry: a retrospective analysis. **Avian Diseases**, v. 59, n. 4, p. 543–7, 2015.

MARCHÉ, S.; VAN DEN BERG, T. Evaluation of different strategies for the use of ELISA tests as first screening tools for serologic surveillance of low pathogenic avian influenza in the Belgian poultry sector. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 627–631, 2010. Supplement.

MARCHÉ, S.; VAN DEN BERG, T.; LAMBRECHT, B. Evaluation of the kinetics of anti-NP and anti-HA antibody after infection of Pekin ducks with low pathogenic avian influenza virus. **Veterinary Medicine and Science**, v. 2, n. 1, p. 36–46, 2016.

MARKS, F. S. **Inquérito epidemiológico de doenças respiratórias em aves de subsistência e modelagem de espalhamento de influenza aviária no Rio**

Grande do Sul. 2014. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

MATHIEU, C.; MORENO, V.; PEDERSEN, J.; JERIA, J.; AGREDO, M.; GUTIÉRREZ, C.; GARCÍA, A.; VÁSQUEZ, M.; AVALOS, P.; RETAMAL, P. Avian Influenza in wild birds from Chile, 2007-2009. **Virus Research**, v. 199, p. 42–45, 2015.

MATTA, R. F. **Variação sazonal na abundância e biologia reprodutiva da gaivota *Larus dominicanus* Lichtenstein, 1823 (aves: Laridae).** 2014. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

MESTRE, L. A. M.; ROOS, A. L.; NUNES, M. F. Análise das recuperações no Brasil de aves anilhadas no exterior entre 1927 e 2006. **Ornithologia**, v. 4, n. 1, p. 15–35, 2010.

MONNE, I.; ORMELLI, S.; SALVIATO, A.; DE BATTISTI, C.; BETTINI, F.; SALOMONI, A.; DRAGO, A.; ZECCHIN, B.; CAPUA, I.; CATTOLI, G. Development and validation of a one-step real-time PCR assay for simultaneous detection of subtype H5, H7, and H9 avian influenza viruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1769–1773, 2008.

MOORE, F. R.; WOODREY, M. S.; BULER, J. J.; WOLTMANN, S.; SIMONS, T. R. Understanding the stopover of migratory birds: a scale dependent approach. **Bird Conservation Implementation and Integration in the Americas: Proceedings of the Third International Partners in Flight Conference**, p. 684–689, 2005.

MOTA, M. A.; LIMA, F. S.; OLIVEIRA, P. F. N.; GUIMARÃES, M. P. Ações de vigilância para influenza aviária desenvolvida no Brasil, no período de 2004 e 2007. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1265–1273, 2013.

MUNSTER, V. J.; BAAS, C.; LEXMOND, P.; WALDENSTRÖM, J.; WALLENSTEN, A.; FRANSSON, T.; RIMMELZWAAN, G. F.; BEYER, W. E. P.; SCHUTTEN, M.; OLSEN, B.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FOUCHIER, R. A. M. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. **PLoS Pathogens**, v. 3, n. 5, p. 0630–0638, 2007.

MUNSTER, V. J.; FOUCHIER, R. A. M. Avian influenza virus: of virus and bird ecology. **Vaccine**, v. 27, n. 45, p. 6340–6344, 2009.

NATIONAL AUDUBON SOCIETY. Flyways of the Americas. Disponível em: <<http://www.audubon.org/birds/flyways>>. Acesso em: 20 jun 2016.

NELSON, M. I.; POLLETT, S.; GHERSI, B.; SILVA, M.; SIMONS, M. P.; ICOCHEA, E.; GONZALEZ, A. E.; SEGOVIA, K.; KASPER, M. R.; MONTGOMERY, J. M.; BAUSCH, D. G. The genetic diversity of influenza A viruses in wild birds in Peru. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2016.

- NESTOROWICZ, A.; KAWAOKA, Y.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G. Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: Role of passerine birds in maintenance or transmission? **Virology**, v. 160, n. 2, p. 411–418, 1987.
- NEWTON, I. The ecology of bird migration patterns. In: BOU Proceedings - The Ecology and Conservation of Migratory Birds, Leicester, Reino Unido. **Proceedings...** Leicester, Reino Unido: 2011.
- OLSEN, B.; MUNSTER, V. J.; WALLENSTEN, A.; WALDENSTRÖM, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FOUCHIER, R. A. M. Global patterns of influenza a virus in wild birds. **Science**, v. 312, n. 5772, p. 384–388, 2006.
- ORSI, M. A.; DORETTO, J.; CAMILLO, S. C. A.; REISCHAK, D.; RIBEIRO, S. A. M.; RAMAZZOTTI, A.; MENDONÇA, A. O.; SPILKI, F. R.; BUZINARO, M. G.; FERREIRA, H. L.; ARNS, C. W. A survey for maintenance of virulent newcastle disease virus-free area in poultry production in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 368–375, 2010.
- OUCHTERLONY, O. Antigen-antibody reactions in gel. **Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica**, v. 26, n. 4, p. 507-515, 1949.
- PANIGRAHY, B.; SENNE, D. A.; PEARSON, J. E. Presence of avian influenza virus (AIV) subtypes H5N2 and H7N1 in emus (*Dromaius novaehollandiae*) and rheas (*Rhea americana*): virus isolation and serologic findings. **Avian Diseases**, v. 39, n. 1, p. 64–67, 1995.
- PASICK, J.; BERHANE, Y.; JOSEPH, T.; BOWES, V.; HISANAGA, T.; HANDEL, K.; ALEXANDERSEN, S. Reassortant highly pathogenic influenza A H5N2 virus containing gene segments related to Eurasian H5N8 in British Columbia, Canada, 2014. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1–4, 2015.
- PASICK, J.; PEDERSEN, J.; HERNANDEZ, M. S. Avian influenza in North America, 2009-2011. **Avian diseases**, v. 56, n. 4, p. 845–8, 2012. Supplement.
- PEDERSEN, J.C. Hemagglutination-Inhibition assay for influenza virus subtype identification and the detection and quantitation of serum antibodies to influenza virus. In: SPACKMAN, E. (Ed.). **Animal influenza virus**. New York, NY: Humana Press, 2014. p. 11-25.
- PAWAR, S. D.; KALE, S. D.; RAWANKAR, A. S.; KORATKAR, S. S.; RAUT, C. G.; PANDE, S. A.; MULLICK, J.; MISHRA, A. C. Avian influenza surveillance reveals presence of low pathogenic avian influenza viruses in poultry during 2009-2011 in the West Bengal State, India. **Virology Journal**, v. 9, n. 1, p. 151, 2012.
- PEDERSEN, K.; SWAFFORD, A. S. R.; DELIBERTO, T. J. Low pathogenicity avian influenza subtypes isolated from wild birds in the United States, 2006-2008. **Avian Disease**, v. 54, n. 1, p. 405–410, 2010. Supplement.

PEIRIS, J. S. M.; DE JONG, M. D.; GUAN, Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 2, p. 243–267, 2007.

PEREDA, A. J.; UHART, M.; PEREZ, A. A.; ZACCAGNINI, M. E.; LA, L.; DECARRE, J.; GOIJMAN, A.; SOLARI, L.; SUAREZ, R.; CRAIG, M. I.; VAGNOZZI, A.; RIMONDI, A.; KÖNIG, G.; TERRERA, M. V.; KALOGHLIAN, A.; SONG, H.; SORRELL, E. M.; PEREZ, D. R. Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. **Virology**, v. 378, n. 2, p. 363–370, 2008.

PÉREZ-RAMÍREZ, E.; RODRÍGUEZ, V.; SOMMER, D.; BLANCO, J. M.; ACEVEDO, P.; HEFFELS-REDMANN, U.; HÖFLE, U. Serologic testing for avian influenza viruses in wild birds: comparison of two commercial competition enzyme-linked immunosorbent assays. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 729–733, 2010.

PILLAI, S. P. S.; LEE, C. W. Species and age related differences in the type and distribution of influenza virus receptors in different tissues of chickens, ducks and turkeys. **Virology Journal**, v. 7, n. 5, p. 1–8, 2010.

POETRANTO, E. D.; YAMAOKA, M.; NASTRI, A. M.; KRISNA, L. A. W.; RAHMAN, M. H.; WULANDARI, L.; YUDHAWATI, R.; GINTING, T. E.; MAKINO, A.; SHINYA, K.; KAWAOKA, Y. An H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a local tree sparrow in Indonesia. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 9, p. 666–672, 2011.

PROKUDINA, E. N.; SEMENOVA, N. P. Localization of the influenza virus nucleoprotein: cell-associated and extracellular non-virion forms. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 7, p. 1699–1702, 1991.

PU, J.; ZHANG, G.; MA, J.; XIA, Y.; LIU, Q.; JIANG, Z.; WANG, Z.; BROWN, E. G.; TIAN, F.; LIU, J. Serologic evidence of prevalent avian H3 subtype influenza virus infection in chickens. **Avian Diseases**, v. 53, n. 2, p. 198–204, 2009.

RABINOWITZ, P.; PERDUE, M.; MUMFORD, E. Contact variables for exposure to avian influenza H5N1 virus at the human-animal interface. **Zoonoses and Public Health**, v. 57, n. 4, p. 227–238, 2010.

RIMONDI, A.; XU, K.; CRAIG, M. I.; SHAO, H.; FERREYRA, H.; RAGO, M. V.; ROMANO, M.; UHART, M.; SUTTON, T.; FERRERO, A.; PEREZ, D. R.; PEREDA, A. Phylogenetic analysis of H6 influenza viruses isolated from rosy-billed pochards (*Netta peposaca*) in Argentina reveals the presence of different HA gene clusters. **Journal of Virology**, v. 85, n. 24, p. 13354–13362, 2011.

ROCHE, B.; LEBARBENCHON, C.; GAUTHIER-CLERC, M.; CHANG, C. M.; THOMAS, F.; RENAUD, F.; VAN DER WERF, S.; GUEGAN, J. F. Water-borne transmission drives avian influenza dynamics in wild birds: The case of the 2005–2006 epidemics in the Camargue area. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 9, n. 5, p. 800–805, 2009.

RYAN-POIRIER, K. A.; KATZ, J. M.; WEBSTER, R. G.; KAWAOKA, Y. Application of directigen FLU-A for the detection of influenza A virus in human and nonhuman specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 1072–1075, 1992.

SABARINATH, A.; SABARINATH, G. P.; TIWARI, K. P.; KUMTHEKAR, S. M.; THOMAS, D.; SHARMA, R. N. Virological and serological surveillance of avian influenza virus in the birds of Grenada. **International Journal of Poultry Science**, v. 10, n. 8, p. 579–582, 2011.

SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L.; JOHNE, R. PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, n. 5, p. 1014–1026, 2012.

SCOTCH, M.; LAM, T. T.; PABILONIA, K. L.; ANDERSON, T.; BAROCH, J.; KOHLER, D.; DELIBERTO, T. J. Diffusion of influenza viruses among migratory birds with a focus on the Southwest United States. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 26, p. 185–193, 2014.

SEDYANINGSIH, E. R.; ISFANDARI, S.; SETIAWATY, V.; RIFATI, L.; HARUN, S.; PURBA, W.; IMARI, S.; GIRIPUTRA, S.; BLAIR, P. J.; PUTNAM, S. D.; UYEKI, T. M.; SOENDORO, T. Epidemiology of cases of H5N1 virus infection in Indonesia, July 2005-June 2006. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. 4, p. 522–527, 2007.

SENNE, D. A. Avian influenza in the western hemisphere including the pacific Islands and Australia. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 798–805, 2003.

SENNE, D. A. Avian influenza in North and South America, the Caribbean, and Australia, 2006-2008. **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 179–186, 2010. Supplement.

SERRÃO, E.; MEERS, J.; PYM, R.; COPLAND, R.; EAGLES, D.; HENNING, J. Prevalence and incidence of Newcastle disease and prevalence of Avian Influenza infection of scavenging village chickens in Timor-Lesté. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 104, n. 3-4, p. 301–308, 2012.

SHAFFER, A. L.; KATZ, J. B.; EERNISSE, K. A. Development and validation of a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for detection of type A influenza antibodies in avian sera. **Avian Diseases**, v. 42, n. 1, p. 28–34, 1998.

SHARMA, J. M. Overview of the avian immune system. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 30, n. 1, p. 13–17, 1991.

SHARP, G. B.; KAWAOKA, Y.; JONES, D. J.; BEAN, W. J.; PRYOR, S. P.; HINSHAW, V.; WEBSTER, R. G. Coinfection of wild ducks by influenza A viruses : distribution patterns and biological significance. **Journal of Virology**, v. 71, n. 8, p. 6128–6135, 1997.

SHEKAILI, T. AI; CLOUGH, H.; GANAPATHY, K.; BAYLIS, M. Sero-surveillance and

risk factors for avian influenza and Newcastle disease virus in backyard poultry in Oman. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 122, n. 1-2, p. 145–153, 2015.

SHETA, B.M.; FULLER, T.L.; LARISON, B.; NJABO, K.Y.; AHMED, A.S.; HARRIGAN, R.; CHASAR, A.; AZIZ, S.A.; KHIDR, A.A.; ELBOKL, M.M.; HABBAK, L.Z.; SMITH, T. B. Putative human and avian risk factors for avian influenza virus infections in backyard poultry in Egypt. **Veterinary Microbiology**, v. 168, n. 1, p. 208–213, 2014.

SHULTZ, U.; MAGOR, K. E. Comparative immunology of agricultural birds. In: DAVISON, F.; KASPERS, B.; SCHAT, K. A. (Ed.). **Avian Immunology**. London, UK: Academic Press, 2008. p. 395-420.

SIMS, L. D.; BROWN, I. H. Multicontinental epidemic of H5N1 HPAI virus (1996-2007). In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008b. p. 251-286.

SIMS, L. D.; TURNER, A. J. Avian influenza in Australia. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008b. p. 239-250.

SLOMKA, M. J.; PAVLIDIS, T.; BANKS, J.; SHELL, W.; MCNALLY, A.; ESSEN, S.; BROWN, I. H. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 373–377, 2007.

SLUSHER, M. J.; WILCOX, B. R.; LUTRELL, M. P.; POULSON, R. L.; BROWN, J. D.; YABSLEY, M. J.; STALLKNECHT, D. E. Are passerine birds reservoirs for influenza A viruses? **Journal of Wildlife Diseases**, v. 50, n. 4, p. 792–809, 2014.

SMITH, G.; DUNIPACE, S. How backyard poultry flocks influence the effort required to curtail avian influenza epidemics in commercial poultry flocks. **Epidemics**, v. 3, n. 2, p. 71–75, 2011.

SNYDER, D.B.; MARQUARDT, W.W.; YANCEY, F.S.; SAVAGE, P. K. An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the detection of antibody against avian influenza virus. **Avian Diseases**, v. 29, n. 1, p. 136–144, 1985.

SONG, D. S.; LEE, Y. J.; JEONG, O. M.; KIM, Y. J.; PARK, C. H.; YOO, J. E.; JEON, W. J.; KWON, J. H.; HA, G. W.; KANG, B. K.; LEE, C. S.; KIM, H. K.; JUNG, B. Y.; KIM, J. H.; OH, J. S. Evaluation of a competitive ELISA for antibody detection against avian influenza virus. **Journal of Veterinary Science**, v. 10, n. 4, p. 323–329, 2009.

SOUSA, E.; COSTA, T.; WERTHER, K.; DURIGON, E.; ARAUJO, D. J.; FERREIRA, C.; PINTO, A. Presence of antibodies against H5, H7 and H9 influenza A virus in wild birds in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 15, n. 3, p. 169–172, 2013.

SPACKMAN, E.; IP, H. S.; SUAREZ, D. L.; SLEMONS, R. D.; STALLKNECHT, D. E. Analytical validation of a real-time reverse transcription polymerase chain reaction

test for Pan-American lineage H7 subtype Avian influenza viruses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 20, n. 5, p. 612–616, 2008.

SPACKMAN, E.; MCCRACKEN, K. G.; WINKER, K.; SWAYNE, D. E. H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys. **Journal of Virology**, v. 80, n. 15, p. 7760–7764, 2006.

SPACKMAN, E.; PEDERSEN, J. C.; MCKINLEY, E. T.; GELB, J. Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. **BMC Veterinary Research**, v. 9, n. 1, p. 35, 2013.

SPACKMAN, E.; SENNE, D. A.; MYERS, T. J.; BULAGA, L. L.; GARBER, L. P.; PERDUE, M. L.; LOHMAN, K.; DAUM, L. T.; SUAREZ, D. L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3256–3260, 2002.

SPACKMAN, E.; SUAREZ, D.L.; SENNE, D. A. Avian influenza diagnostics and surveillance methods. In: SWAYNE, D.E (Ed.). **Avian Influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. p. 299-308.

STALLKNECHT, D. E.; BROWN, J. D. Ecology of avian influenza in wild birds. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. p. 23-58.

STALLKNECHT, D. E.; KEARNEY, M. T.; SHANE, S. M.; ZWANK, P. J. Effects of pH, Temperature, and Salinity on Persistence of Avian Influenza Viruses in Water. **Avian Diseases**, v. 34, n. 2, p. 412–418, 1990a.

STALLKNECHT, D. E.; SHANE, A. C. S. M.; KEARNEY, A. M. T.; ZWANKBD, P. J. Persistence of Avian Influenza Viruses in Water. **Avian Diseases**, v. 34, n. 2, p. 406–411, 1990b.

STARICK, E.; WERNER, O.; SCHIRRMEIER, H.; KÖLLNER, B.; RIEBE, R.; MUNDT, E. Establishment of a competitive ELISA (cELISA) system for the detection of influenza A virus nucleoprotein antibodies and its application to field sera from different species. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v. 53, n. 8, p. 370–375, 2006.

SUAREZ, D. L. Influenza A virus. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. p. 3-22.

SUAREZ, D. L.; DAS, A.; ELLIS, E. Review of Rapid Molecular Diagnostic Tools for Avian Influenza Virus. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 201–208, 2007. Supplement.

SUAREZ, D. L.; SCHULTZ-CHERRY, S. Immunology of avian influenza virus: a review. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 24, n. 2-3, p. 269–283,

2000.

SULTANA, R.; NAHAR, N.; RIMI, N. A.; AZAD, S.; ISLAM, M. S.; GURLEY, E. S.; LUBY, S. P. Backyard poultry raising in Bangladesh: a valued resource for the villagers and a setting for zoonotic transmission of avian influenza. A qualitative study. **Rural and Remote Health**, v. 12, n. 3, p. 1–14, 2012.

SWAYNE, D. E. Understanding the complex pathobiology of high pathogenicity avian influenza viruses in birds. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 242–249, 2007. Supplement.

SWAYNE, D. E. Epidemiology of avian influenza in agricultural and other man-made systems. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. p. 59-85.

SWAYNE, D. E. The global nature of avian influenza. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008a. p. 123-143.

SWAYNE, D. E. High pathogenicity avian influenza in Americas. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008b. p. 191-216.

SWAYNE, D. E.; KAPCZYNSKI, D. R. Vaccines, vaccination, and immunology for avian influenza viruses in poultry. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008b. p. 407-451.

SWAYNE, D. E.; PANTIN-JACKWOOD, M. Pathobiology of avian influenza virus infections in birds and mammals. In: SWAYNE, D. E (Ed.). **Avian influenza**. Ames, IA: Blackwell Publishing, 2008. p. 87-122.

TELINO-JÚNIOR, W. R.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M. De; LYRA-NEVES, R. M. De. Censo de aves migratórias (Charadriidae, Scolopacidae e Laridae) na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 3, p. 451–456, 2003.

TERREGINO, C.; DE NARDI, R.; GUBERTI, V.; SCREMIN, M.; RAFFINI, E.; MARTIN, A. M.; CATTOLI, G.; BONFANTI, L.; CAPUA, I. Active surveillance for avian influenza viruses in wild birds and backyard flocks in Northern Italy during 2004 to 2006. **Avian Pathology**, v. 36, n. 4, p. 337–344, 2007.

TIENSIN, T.; CHAITAWEE SUB, P.; SONGSERM, T.; CHAISINGH, A.; HOONSUWAN, W.; BURANATHAI, C.; PARAKAMAWONGSA, T.; PREMASHHIRA, S.; AMONSIN, A.; GILBERT, M.; NIELEN, M.; STEGEMAN, A. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. **Emerging Infectious Disease Journal**, v. 11, n. 11, p. 1664–1672, 2005.

TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D. A. 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**, v. 109, n. 11, p. 4269–4274, 2012.

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; YANG, H.; CHEN, X.; RECUENCO, S.; GOMEZ, J.; CHEN, L. M.; JOHNSON, A.; TAO, Y.; DREYFUS, C.; YU, W.; MCBRIDE, R.; CARNEY, P. J.; GILBERT, A. T.; CHANG, J.; GUO, Z.; DAVIS, C. T.; PAULSON, J. C.; STEVENS, J.; RUPPRECHT, C. E.; HOLMES, E. C.; WILSON, I. a.; DONIS, R. O. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.

TSENG, C. H.; TSAI, H. J.; CHANG, C. M. A complete molecular diagnostic procedure for applications in surveillance and subtyping of avian influenza virus. **BioMed Research International**, v. 2014, n. ID 653056, p. 7, 2014.

VAN BORM, S.; STEENSELS, M.; FERREIRA, H. L.; BOSCHMANS, M.; DE VRIESE, J.; LAMBRECHT, B.; VAN DEN BERG, T. A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification. **Avian Diseases**, v. 51, n. 1, p. 213–220, 2007.

VAN DEN BERG, T. The role of the legal and illegal trade of live birds and avian products in the spread of avian influenza. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 28, n. 1, p. 93–111, 2009.

VAN GILS, J. A.; MUNSTER, V. J.; RADERSMA, R.; LIEFHEDDER, D.; FOUCHIER, R. A. M.; KLAASSEN, M. Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. **PLoS ONE**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2007.

VAN KERKHOVE, M. D.; MUMFORD, E.; MOUNTS, A. W.; BRESEE, J.; LY, S.; BRIDGES, C. B.; OTTE, J. Highly pathogenic avian influenza (H5N1): pathways of exposure at the animal-human interface, a systematic review. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 1–8, 2011.

VANDEGRIFT, K.; SOKOLOW, S.; DASZAK, P.; KILPATRICK, A. Ecology of avian influenza viruses in a changing world. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 115, p. 113–128, 2010.

VERHAGEN, J. H.; JEUGD, H. P. Van Der; NOLET, B. A.; SLATERUS, R.; KHARITONOV, S. P.; VRIES, P. P. De; VUONG, O.; MAJLOOR, F.; KUIKEN, T. Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A (H5N8) virus in the Netherlands , 2014 , within the context of global flyways. **Euro Surveillance**, v. 20, n. 12, p. 21–35, 2015.

WANG, G.; DENG, G.; SHI, J.; LUO, W.; ZHANG, G.; ZHANG, Q.; LIU, L.; JIANG, Y.; LI, C.; SRIWILAIJAROEN, N.; HIRAMATSU, H.; SUZUKI, Y.; KAWAOKA, Y.; CHEN, H. H6 influenza viruses pose a potential threat to human health. **Journal of Virology**, v. 88, n. 8, p. 3953–3964, 2014a.

WANG, G.; ZHANG, T.; LI, X.; JIANG, Z.; JIANG, Q.; CHEN, Q.; TU, X.; CHEN, Z.; CHANG, J.; LI, L.; XU, B. Serological evidence of H7, H5 and H9 avian influenza virus co-infection among herons in a city park in Jiangxi, China. **Scientific Reports**, v. 4, n. 6345, p. 1–6, 2014b.

WANG, Y.; JIANG, Z.; JIN, Z.; TAN, H.; XU, B. Risk factors for infectious diseases in backyard poultry farms in the Poyang Lake Area, China. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. 1–10, 2013.

WATANABE, T.; WATANABE, S.; MAHER, E. A.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 11, p. 623–631, 2014.

WEBSTER, R.; BEAN, W.; GORMAN, O.; CHAMBERS, T.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 152–179, 1992.

WEBSTER, R. G.; HULSE, D. J. Microbial adaptation and change: avian influenza. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v. 23, n. 2, p. 453–465, 2004.

WEGDAN, H. A.; KHAIR, S. A. M.; MANSOUR, M. E. Serological survey of avian influenza type A and subtype A antibodies in chickens sera in Sudan using AGID and HAI tests. **International Journal of Preventive Medicine Research**, v. 1, n. 5, p. 282–284, 2015.

WERNER, O.; STARICK, E.; GRUND, C. H. Isolation and characterization of a low-pathogenicity H7N7 influenza virus from a turkey in a small mixed free-range poultry flock in Germany. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 1104–6, 2003.

WETLANDS INTERNATIONAL. What are flyways?. Disponível em: <<http://wpe.wetlands.org/lwhatfly>>

WHITEHEAD, M. L.; ROBERTS, V. Backyard poultry: legislation, zoonoses and disease prevention. **Journal of Small Animal Practice**, v. 55, n. 10, p. 487–496, 2014.

WIKIAVES. Espécies registradas em ESEC do Taim/RS. Disponível em: <http://www.wikiaves.com.br/especies_ao.php?&t=ao&ao=863>. Acesso em: 20 jun. 2016.

WIKIAVES. Marrecão. Disponível em: <<http://www.wikiaves.com.br/marrecao>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

WILLIAMS, R. A. J.; SEGOVIA-HINOSTROZA, K.; GHERSI, B. M.; GONZAGA, V.; PETERSON, A. T.; MONTGOMERY, J. M. Avian influenza infections in nonmigrant land birds in Andean Peru. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 4, p. 910–917, 2012.

WILTSCHKO, R.; WILTSCHKO, W. Avian navigation: from historical to modern concepts. **Animal Behaviour**, v. 65, n. 2, p. 257–272, 2003.

WOOLCOCK, P. R.; CARDONA, C. J. Commercial immunoassay kits for the detection of influenza virus type A: evaluation of their use with poultry. **Avian Diseases**, v. 49, n. 17, p. 477–81, 2005.

WOOLCOCK, P. R.; SUAREZ, D. L.; KUNEY, D. Low-pathogenicity avian influenza virus (H6N2) in chickens in California, 2000-02. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 872–81, 2003. Supplement.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. In: _____. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2013. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/1.01.06_VALIDATION.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Avian Influenza (infection with avian influenza viruses). In: _____. **Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals**. Paris: OIE, 2015. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf>. Acesso em: 20 jun. 2016.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE). Glossary. In: _____. **Terrestrial Animal Health Code**. Paris: OIE, 2016. Disponível em: <<http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=glossaire.htm>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

YAMAMOTO, T.; TSUTSUI, T.; NISHIGUCHI, A.; KOBAYASHI, S.; TSUKAMOTO, K.; SAITO, T.; MASE, M.; OKAMATSU, M. Preliminary evaluation of diagnostic tests for avian influenza using the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) Method in an emergency surveillance. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 69, n. 6, p. 673–675, 2007.

YANG, M.; CLAVIJO, A.; PASICK, J.; SALO, T.; WANG, Z.; ZHAO, Y.; ZHENG, D.; BERHANE, Y. Serologic detection of Avian influenza H5 antibodies using a competitive enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Journal of Veterinary Medicine and Animal Health**, v. 3, n. 4, p. 56–61, 2011.

YEWDELL, J. W.; BENNINK, J. R.; SMITH, G. L.; MOSS, B. Influenza A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 6, p. 1785–1789, 1985.

YUAN, J.; ZHANG, L.; KAN, X.; JIANG, L.; YANG, J.; GUO, Z.; REN, Q. Origin and molecular characteristics of a novel 2013 avian influenza a(H6N1) virus causing human infection in Taiwan. **Clinical Infectious Diseases**, v. 57, n. 9, p. 1367–1368, 2013.

ZHENG, T.; ADLAM, B.; RAWDON, T. G.; STANISLAWEK, W. L.; CORK, S. C.; HOPE, V.; BUDDLE, B. M.; GRIMWOOD, K.; BAKER, M. G.; O'KEEFE, J. S.; HUANG, Q. S. A cross-sectional survey of influenza A infection and management practices in small rural backyard poultry flocks in New Zealand. **New Zealand Veterinary Journal**, v. 58, n. 2, p. 74–80, 2010.

ZHENG, W.; TAO, Y. J. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. **FEBS Letters**, v. 587, n. 8, p. 1206-1214, 2013.

ZHOU, E.-M.; CHAN, M.; HECKERT, R. A.; RIVA, J.; CANTIN, M.-F. Evaluation of a competitive ELISA for detection of antibodies against avian influenza virus nucleoprotein. **Avian Diseases**, v. 42, n. 3, p. 517–522, 1998.

ZHU, X.; YANG, H.; GUO, Z.; YU, W.; CARNEY, P. J.; LI, Y.; CHEN, L.-M.; PAULSON, J. C.; DONIS, R. O.; TONG, S.; STEVENS, J.; WILSON, I. a. Crystal structures of two subtype N10 neuraminidase-like proteins from bat influenza A viruses reveal a diverged putative active site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 46, p. 18903–18908, 2012.