RENATA FERREIRA HURTADO

**Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves
migratórias na região costeira da Amazônia**

São Paulo

2013

RENATA FERREIRA HURTADO

**Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região
costeira da Amazônia**

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. José Antonio Jerez

De acordo: _____

São Paulo

2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2896
FMVZ

Hurtado, Renata Ferreira
Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da
Amazônia / Renata Ferreira Hurtado. -- 2013.
122 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Jerez.

1. Vírus da influenza A. 2. Anseriformes. 3. Charadriiformes. 4. Região Amazônica. 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 "Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia", protocolado sob o nº 1752/2009, utilizando 2400 (duas mil e quatrocentas) aves, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Antonio Jerez, está 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 de 9/9/2009.

We certify that the Research "Epidemiological Surveillance of avian influenza virus in migratory birds on the Amazon coast", protocol number 1752/2009, utilizing 2400 (two thousand four hundred) birds, under the responsibility Prof. Dr. José Antonio Jerez, 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 in the meeting of day 9/9/2009.

São Paulo, 24 de outubro de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21211-1	Data da Emissão: 21.08.2009 15:34
Dados do titular	
Nome: Renata Ferreira Hurtado	CPF: 323.144.298-26
Título do Projeto: Monitoramento do vírus da influenza A em aves migratórias na região Amazônica brasileira pela técnica de Real Time RT-PCR	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	10/2009	10/2009
2	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	12/2009	12/2009
3	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	02/2010	12/2010
4	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	04/2010	04/2010
5	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	10/2010	10/2010
6	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	12/2010	12/2010
7	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	02/2011	02/2011
8	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	04/2011	04/2011
9	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	10/2011	10/2011
10	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	12/2011	12/2011
11	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	02/2012	02/2012
12	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	04/2012	04/2012
13	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	10/2012	10/2012
14	Captura e coleta de material biológico das aves migratórias no Estado do Pará	12/2012	12/2012

De acordo com o art 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar estrobo de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico.
8	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade e fim de CON FIRMAR AS D AT AS das expdições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
9	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constantes de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sob reexplotadas ou ameaçadas de sob reexplotação.

Outras ressalvas

1	- Conforme o Art 14 da IN 154/07 esta autorização não exime o seu titular da necessidade de atender às condicionantes previstas na IN 27/02, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento. - A quantidade recomendada de sangue a ser coletado não deve ultrapassar 1% do peso do indivíduo, quantidade suficiente para os objetivos propostos, sendo o quantitativo autorizado para diversas pesquisas no Brasil.
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
---	------	--------	-----	-----------------	---------------

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. Através do código de autenticação a baixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61834981

Página 1/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21211-1	Data da Emissão: 21/08/2009 15:34
Dados do titular	
Nome: Renata Ferreira Hurtado	CPF: 323.144.298-26
Título do Projeto: Monitoramento do vírus da influenza A em aves migratórias na região Amazônica brasileira pela técnica de Real Time RT-PCR	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

1	Tatiana Lopez Ometto	pesquisadora	315.167.738-02	24521167-6 SSP-SP	Brasil
2	Janzen de Araujo	pesquisador	286.516.198-68	27412780-5 SSP-SP	Brasil
3	Bilson Luiz Durigon	pesquisador	004.242.028-88	8034494-X SSP-SP	Brasil

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	BRAGANÇA	PA	Ilha de Canelas	Fora de UC
2	BREVES	PA	Breves	Fora de UC
3	SALINÓPOLIS	PA	Salinópolis	Fora de UC
4	SÃO SEBASTIÃO DA BOA VISTA	PA	São Sebastião da Boa Vista	Fora de UC
5	VIGIA	PA	Vigia de Nazaré	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Aves
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Aves
3	Marcação de animais silvestres in situ	Aves

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Sangue, Fezes
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina
3	Método de marcação (Aves)	Anilha de Alumínio (padrão CBMAVE)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB II - USP

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61834981

Página 2/3

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 21211-1	Data da Emissão: 21/08/2009 15:34
Dados do titular	
Nome: Renata Ferreira Hurtado	CPF: 323.144.298-26
Título do Projeto: Monitoramento do vírus da influenza A em aves migratórias na região Amazônica brasileira pela técnica de Real Time RT-PCR	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 61834981

Página 3/3

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: HURTADO, Renata Ferreira

Título: Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia

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

À minha família, *minha base*

Ao Ralph Vanstreels, *meu amor*

Às aves silvestres, *minha motivação*

AGRADECIMENTOS

ACKNOWLEDGEMENTS

Aos meus pais Jeff e Ligia, por sempre me incentivarem, pelo amor e apoio incondicional. Vocês são meus alicerces e os grandes responsáveis por tudo o que eu sou. Nunca poderei agradecer o que vocês têm feito por mim!

À minha querida irmã Thais, por ser minha companheira de vida!

Ao Ralph Vanstreels, que não deixou de me apoiar e me incentivar nem um minuto sequer.. que não saiu do meu lado nos momentos mais difíceis. Muito obrigada por tudo, dos conselhos às análises estatísticas! Sem você tudo teria sido mais difícil; não existem palavras suficientes para te agradecer!

Ao meu cunhado Thor, por ser um grande incentivador e torcer sempre por mim!

Aos meus amigos e orientadores Prof. Dr. Edison Luiz Durigon e Prof. Dr. José Antonio Jerez, pelo apoio, atenção, auxílio e oportunidades concedidas. Obrigada por acreditarem e confiarem na minha capacidade em desenvolver um projeto tão desafiador e apaixonante.

Ao Prof. Dr. Severino Mendes de Azevedo-Júnior, pela fundamental contribuição fornecida durante as seis expedições científicas ao Pará e por compartilhar seus conhecimentos em ornitologia.

To the researchers at the Department of Infectious Diseases - Division of Virology of the St. Jude Children's Research Hospital (Memphis, Tennessee) with whom I've had the great opportunity to learn and develop part of my PhD. Thank you all for the good moments we spent together and all the teachings (Allison, Angie, Atanaska, Ghazi, Ira, Jeremy, Kim, Mark, Min-Suk, Sook-San, Sun-Woo, Trushar and Zeynep). In particular, I am hugely thankful to Dr. Richard J. Webby, Dr. Robert G. Webster, Scott Krauss, David Walker, Thomas Fabrizio and John Franks for all the assistance and kindness. Thank you so much!

I'd like to thank Prof. Marcel Klaassen and the colleagues at the Centre of Integrative Ecology of the Deakin University (Victoria, Australia), in particular Simeon, Jacintha, Yaara, and Meijuan, for the fantastic opportunity to participate in the field expedition and labwork.

Merci beaucoup to the friends Dr. Nicholas Gaidet and Gilles Balança from *Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement* – CIRAD (France) for the great time we spent together in the field at the Islamic Republic of Mauritania, and for teaching me so much about the capture and handling of aquatic birds. *Doni doni l'oiseau fait son nid* – I've not forgotten it!

Aos amigos do trabalho em campo: Pedro Jorge, Flor Maria, Thyago Almeida e, em especial, Mário Silva (“Baixinho”) e Roberta Rodrigues - dois companheiros presentes em todas as expedições. Obrigada a todos por terem suportado firmemente o trabalho pesado, as dificuldades e as noites sem dormir que vivenciamos na Ilha de Canelas, Pará.

Aos colegas e ex-colegas do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciência Biomédicas da USP: Carla Barbosa, Carolina Ferreira, Cristiane Demétrio, Danielle Bastos, Danielle Bruna de Oliveira, Danila Vedovello, Erika Donizetti, Fábio Maués, Felipe Moraes, Jansen de Araújo, Lilia Mara, Luciano Thomazelli, Luiz Gustavo Góes, Marina Seixas, Raquel Negrão, Tatiana Lopes Ometto e Thaís Cristina; e às professoras Maria Luisa (Malu) Barbosa, Viviane Botosso e Silvana Favoretto.

À Angélica C. A. Campos, pelo grande auxílio na construção das árvores filogenéticas e interpretação destes dados.

Ao amigo e técnico de laboratório Zé Maria, por estar sempre por perto e disposto a ajudar.

A toda a comunidade paraense dos municípios de Bragança e Tracuateua, pelas portas abertas em permitir o trabalho com as aves.

À Agência de Defesa Agropecuária do Estado do Pará (ADEPARÁ) por todo e imenso apoio sempre disponibilizado, fundamental para o sucesso de nossas expedições; agradeço em especial aos funcionários Leonardo Bonfim, Arlinéia Rodrigues e Daniele Galindo.

À Dra. Darleise Oliveira (Laboratório de Parvovírus B19/SAVIR do Instituto Evandro Chagas), pelo seu enorme apoio logístico e contribuição para o funcionamento pleno das expedições.

Aos Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Wildlife Conservation Society (WCS), pelos primeiros auxílios financeiros concedidos, fundamentais para iniciar este projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de pós-graduação e reserva técnica, essenciais para viabilizar este estudo (processo 2009/10695-o).

À Universidade de São Paulo (USP), pela oportunidade de me aprimorar profissionalmente e pelos apoios financeiros sempre concedidos.

À todos os membros da Banca examinadora, por aceitarem o convite de discutir e avaliar este trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP, em especial Cristina Paick e Danival Moreira, por serem tão atenciosos e dispostos a ajudar.

Às funcionárias Elza Faquim e Neusa Abe da Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da FMVZ - USP, pelas correções na formatação da tese e orientações referentes às normas bibliográficas, respectivamente.

Aos meus amigos da república Zimbabwe: Alessandro, Brian, Bira, Renan, Gustavo; e também às queridas agregadas Flávia, Mariana e Simone. Obrigada pelos inúmeros

momentos de descontração, risadas e festas que compartilhamos em nosso “complexo residencial”.

Aos meus amigos tão queridos, que me proporcionaram ótimos momentos durante o desenvolvimento deste projeto: Aline Kehrle (irmã), Marina Seixas, Marta Guimarães, Vanessa Primante, Camila Bello (república Zâmbia), Vivian Lindmayer Ferreira, Laura e Lica Reisfeld, Valeria Ruoppolo, Mariana Vieira, Victor Pimentel, Patrícia Serafini, Mary e Chris Vanstreels, Alessandra Nava, Patrícia Guimarães, Juliana Saviolli, Leo Francini, Vini Mezzanotti, Mariana Perez, Michael Pasquini, Chris Walker e Reinaldo Silva.

À todos os amigos da Aiuká Consultoria em Soluções Ambientais e do Centro de Recuperação de Animais Marinhos da Universidade Federal do Rio Grande (CRAM-FURG) pelos bons momentos que passamos juntos.

Ao amigo fotógrafo-ornitólogo Ciro Albano, pela linda foto da capa.

Aos meus familiares, que me apoiaram e souberam entender minha ausência nos últimos anos.

Às minhas companheiras de quatro patas, Julie e Peteca.

Jamais poderia deixar de agradecer ao meu maior estímulo para desenvolver este estudo: as aves silvestres! Mesmo contrariadas, foram simplesmente fundamentais para a realização da tese.

E, por fim, à todos os amigos e colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a finalização desta importante etapa!

“It was passed from one bird to another,
the whole gift of the day.
The day went from flute to flute,
went dressed in vegetation,
in flights which opened a tunnel
through the wind would pass
to where birds were breaking open
the dense blue air -
and there, night came in.

When I returned from so many journeys,
I stayed suspended and green
between sun and geography -
I saw how wings worked,
how perfumes are transmitted
by feathery telegraph,
and from above I saw the path,
the springs and the roof tiles,
the fishermen at their trades,
the trousers of the foam;
I saw it all from my green sky.
I had no more alphabet
than the swallows in their courses,
the tiny, shining water
of the small bird on fire
which dances out of the pollen”

PABLO NERUDA

RESUMO

HURTADO, R. F. **Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia.** [*Epidemiological surveillance of avian influenza viruses in migratory birds on the Amazon coast*]. 2013. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Os vírus da influenza aviária, ou vírus da influenza A, podem acometer inúmeras espécies de aves e mamíferos, e são conhecidos pelos relevantes impactos gerados na economia e Saúde Pública. As aves pertencentes às ordens Anseriformes (patos, marrecos e cisnes) e Charadriiformes (maçaricos, gaivotas e trinta-réis) são consideradas reservatórios, sendo que o comportamento migratório de muitas destas espécies pode favorecer a disseminação viral entre países. Existem poucos estudos sobre a circulação dos vírus da influenza aviária na América do Sul, dificultando a compreensão da ecologia e epidemiologia destes patógenos no Brasil. Este trabalho tem como objetivo monitorar as aves migratórias, em áreas de descanso e invernada na região Amazônica brasileira, por meio da detecção e caracterização dos vírus da influenza A. Através de seis expedições científicas ao norte do estado do Pará entre 2008 e 2010 foram colhidos *swabs* orotraqueais e cloacais de 1093 aves silvestres, principalmente Anseriformes e Charadriiformes. Pela técnica de *Real time* RT-PCR, nove aves foram positivas: 2 *Actitis macularius*, 4 *Arenaria interpres*, 1 *Calidris pusilla*, 1 *Charadrius semipalmatus* e 1 *Dendrocygna viduata*. Destas, o isolamento viral foi realizado com sucesso a partir das amostras de três *Arenaria interpres*, corroborando estudos que demonstram uma elevada prevalência do vírus da influenza A nesta espécie. As reações de inibição da hemaglutinação e de inibição da neuraminidase revelaram tratar-se do subtipo viral H11N9, considerado de baixa patogenicidade e relativamente comum nestas aves. O sequenciamento genético indicou estreita relação filogenética entre as estirpes virais deste estudo e aquelas isoladas na América do Norte, evidenciando um vínculo epidemiológico entre estas populações. Assim, é essencial a contínua vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves silvestres nesta região, visando a obtenção de informações sobre a prevalência do vírus, subtipos circulantes e suas características patogênicas, para subsidiar medidas apropriadas de prevenção e controle caso ocorram surtos no país.

Palavras-chave: Vírus da influenza A. Anseriformes. Charadriiformes. Região Amazônica. Brasil.

ABSTRACT

HURTADO, R. F. **Epidemiological surveillance of avian influenza viruses in migratory birds on the Amazon coast.** [*Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia*]. 2013. 122 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Avian influenza viruses infect a variety of birds and mammals and are known for their relevant economic and public health impacts. Anseriformes (ducks, mallards and geese) and Charadriiformes (shorebirds, seagulls and terns) are natural reservoirs of avian influenza viruses, and the migratory behaviour of many of these species can result in the spread of the virus among countries. There are few studies investigating the occurrence of these viruses in South America, hindering understanding of their ecology and epidemiology in Brazil. This study aims to detect and characterize avian influenza viruses in migratory birds in wintering areas on the Amazon coast. Orotracheal and cloacal swabs were obtained from 1093 wild birds, mostly Anseriformes and Charadriiformes, during six expeditions between 2008 and 2010 to the state of Pará, Brazil. Samples from nine birds were positive to Real time RT-PCR: 2 *Actitis macularius*, 4 *Arenaria interpres*, 1 *Calidris pusilla*, 1 *Charadrius semipalmatus* e 1 *Dendrocygna viduata*. Virus isolation was successfully carried out for the samples from three *Arenaria interpres*, in agreement with previous studies reporting high prevalence in this species. Hemagglutinin and neuraminidase inhibition assays indicated these strains belonged to subtype H11N9, considered low pathogenic and relatively common in shorebirds. Gene sequencing demonstrated close phylogenetic relationship between the strains isolated in this study and those found in North America, revealing the existence of epidemiological connectivity among these populations. It is therefore vital to maintain active epidemiological surveillance of wild birds in this region, collecting information on virus prevalence, subtype and pathogenicity that may in turn be used to implement prevention and control policies for avian influenza outbreaks.

Key-words: Influenzavirus A. Anseriformes. Charadriiformes. Amazon region. Brazil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ilustração da estrutura do vírus da influenza A.....	34
Figura 2 -	Representação esquemática do ciclo do vírus da influenza A, demonstrando as fases de adesão, endocitose, escape do endossomo, “desempacotamento”, transcrição, tradução, síntese protéica, replicação, “empacotamento” e liberação.....	38
Figura 3 -	Principais rotas migratórias (<i>flyways</i>) de aves que se deslocam entre os Hemisférios Norte e Sul.....	50
Figura 4 -	Principais rotas migratórias que interligam as Américas do Norte, Central e do Sul.....	52
Figura 5 -	Exemplos de aves pertencentes à ordem Anseriformes: (a) pato-real <i>Anas platyrhynchos</i> , (b) marreca-de-asa-azul <i>Anas discors</i> , (c) marreca-cabocla <i>Dendrocygna autumnalis</i> , (d) marreca-irerê <i>Dendrocygna viduata</i>	56
Figura 6 -	Exemplos de aves pertencentes à ordem Charadriiformes: (a) maçarico-pintado <i>Actitis macularius</i> , (b) maçariquinho <i>Calidris pusilla</i> , (c) vira-pedras <i>Arenaria interpres</i> , (d) batuíra-de-bando <i>Charadrius semipalmatus</i>	57
Figura 7 -	Distribuição geográfica das três localidades amostradas (pontos em vermelho) em relação às rotas migratórias (linhas demarcadas em preto) e principais áreas de invernada (pontos em amarelo) e repouso (pontos em verde) utilizadas pelas aves migratórias na América do Sul.....	67
Figura 8 -	Disposição das redes-de-neblina em (a) área aberta e (b) próxima ao manguezal.....	69
Figura 9 -	Aves silvestres mantidas em cativeiro pela população ribeirinha nos municípios de Bragança e Tracuateua: (a) marreca-cabocla <i>Dendrocygna autumnalis</i> e marreca-irerê <i>Dendrocygna viduata</i> , e (b) colhereiro <i>Platalea ajaja</i>	69
Figura 10 -	Colheita de <i>swabs</i> orotraqueal (a) e cloacal (b) em vira-pedras <i>Arenaria interpres</i>	70
Figura 11 -	Diagrama da disposição das amostras e diluições para a reação de hemaglutinação.....	75
Figura 12 -	Diagrama da disposição das amostras e diluições realizadas durante a reação de inibição da hemaglutinação.....	77
Figura 13 -	Diagrama da disposição das amostras e diluições realizadas durante a reação de inibição da neuraminidase.....	79

Figura 14 -	Curvas de fluorescência das nove amostras positivas e do controle positivo ao <i>Real time</i> RT-PCR.....	88
Figura 15 -	Árvore filogenética do gene codificador para HA proveniente das estirpes virais identificadas neste estudo (em vermelho) em relação àquelas identificadas em aves silvestres na América do Norte.....	92
Figura 16 -	Árvore filogenética do gene codificador para NA proveniente das estirpes virais identificadas neste estudo (em vermelho) em relação àquelas identificadas em aves silvestres na América do Norte.....	93

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Organização do genoma do vírus da influenza A.....	34
Quadro 2 -	Expedições científicas realizadas no estado do Pará.....	68
Quadro 3 -	Antisoros utilizados para a reação de inibição da hemaglutinação.....	77
Quadro 4 -	Antisoros utilizados para a reação de inibição da neuraminidase.....	79
Quadro 5 -	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para RT-PCR das glicoproteínas HA e NA.....	80
Quadro 6 -	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para o sequenciamento do gene HA.....	83
Quadro 7 -	Sequências dos <i>primers</i> utilizados para o sequenciamento do gene NA.....	83
Quadro 8 -	Distribuição do esforço amostral (N) e dos indivíduos identificados como positivos ao <i>Real time</i> RT-PCR (entre colchetes) em relação às espécies de aves, localidades e expedições de campo.....	86
Quadro 9 -	Detalhes dos indivíduos cujas amostras obtiveram resultados positivos ao <i>Real time</i> RT-PCR.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Prevalência aparente do vírus da influenza A segundo a técnica de <i>Real time</i> RT-PCR em relação a diferentes critérios de agrupamento de histórico individual ou contexto de amostragem.....	90
------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIV	vírus da influenza aviária (<i>Avian Influenza Viruses</i>)
β-FPA	ácido β-formilpirúvico
bp	pares de base (<i>base pairs</i>)
BSA	albumina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
BSL	nível de biossegurança (<i>Biosafety Level</i>)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cRNA	RNA complementar
CT	limiar do ciclo (<i>Cycle Treshold</i>)
E	especificidade
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	ensaio de imunoadsorção enzimática (<i>Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay</i>)
EPI	Equipamento de Proteção Individual
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>)
HA	hemaglutinina
HI	reação de inibição da hemaglutinação (<i>Hemagglutination Inhibition assay</i>)
HKY+G+I	Hasegawa-Kishino-Yano com distribuição gama e invariância
HPAI	vírus da influenza aviária altamente patogênico (<i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i>)
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IgM	Imunoglobulina M
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza (<i>International Union for Conservation of Nature</i>)
IVPI	índice de patogenicidade intravenosa (<i>Intravenous Pathogenicity Index</i>)
LPAI	vírus da influenza aviária de baixa patogenicidade (<i>Low Pathogenic Avian Influenza</i>)
LPNAI	vírus da influenza aviária notificável de baixa patogenicidade (<i>Low</i>

	<i>Pathogenicity Notifiable Avian Influenza)</i>
M1	<i>Matrix protein 1</i>
M2	<i>Membrane ion channel protein</i>
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i>
ML	máxima verossimilhança (<i>Maximum Likelihood</i>)
mRNA	RNA mensageiro
NA	neuraminidase
NEP	<i>Nuclear export protein</i>
NI	reação de inibição da neuraminidase (<i>Neuraminidase Inhibition assay</i>)
NS1	<i>Nonstructural protein 1</i>
NS2	<i>Nonstructural protein 2</i>
NDV	<i>Newcastle Disease Virus</i>
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal (<i>World Organisation for Animal Health</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
PA	<i>Polymerase Acidic protein</i>
PB1	<i>Polymerase Basic protein 1</i>
PB2	<i>Polymerase Basic protein 2</i>
PBS	tampão fosfato-salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCS	sítio de clivagem proteolítica (<i>Proteolytic Cleavage Site</i>)
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PIB	Produto Interno Bruto
RDE	<i>Receptor-Destroying Enzyme</i>
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase pela transcriptase reversa (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
S	sensibilidade
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SPF	livre de patógenos específicos (<i>Specific Pathogen-Free</i>)
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TAE	Tris-Acetato EDTA
vRNA	RNA de fita simples

LISTA DE ESPÉCIES

Procellariiformes

<i>Oceanites oceanicus</i>	alma-de-mestre
<i>Puffinus pacificus</i>	pardela-do-Pacífico

Pelecaniformes

<i>Eudocimus ruber</i>	guará-vermelho
<i>Platalea ajaja</i>	colhereiro

Ciconiiformes

<i>Egretta caerulea</i>	garça-azul
-------------------------	------------

Anseriformes

<i>Amazonetta brasiliensis</i>	marreca-ananai
<i>Anas acuta</i>	marreca-arrebia
<i>Anser albifrons</i>	ganso-grande-de-testa-branca
<i>Anas americana</i>	piadeira-americana
<i>Anas bahamensis</i>	marreca-toicinho
<i>Anas carolinenses</i>	marreca-de-asa-verde
<i>Anas crecca</i>	marrequinha-comum
<i>Anas clypeata</i>	pato-trombeteiro
<i>Anas cyanoptera</i>	marreca-carijó
<i>Anas discors</i>	marreca-de-asa-azul
<i>Anas formosa</i>	marreca-formosa
<i>Anas georgica</i>	marreca-parda
<i>Anser indicus</i>	ganso-de-cabeça-listrada
<i>Anas platalea</i>	marreca-colhereira
<i>Anas platyrhynchos</i>	pato-real
<i>Anas poecilorhyncha</i>	pato-de-bico-pintado

<i>Anas querquedula</i>	marreco-comum
<i>Anas versicolor</i>	marreca-cricri
<i>Aix galericulata</i>	pato-mandarim
<i>Bucephala clangula</i>	olho-dourado
<i>Cygnus cygnus</i>	cisne-bravo
<i>Cygnus olor</i>	cisne-branco
<i>Dendrocygna autumnalis</i>	marreca-cabocla
<i>Dendrocygna viduata</i>	marreca-irerê
<i>Heteronetta atricapilla</i>	marreca-de-cabeça-preta
<i>Netta peposaca</i>	marrecão

Charadriiformes

<i>Actitis macularius</i>	maçarico-pintado
<i>Arenaria interpres</i>	vira-pedras
<i>Calidris acuminata</i>	maçarico-de-cauda-afiada
<i>Calidris alba</i>	maçarico-branco
<i>Calidris alpina</i>	maçarico-alpino
<i>Calidris canutus</i>	maçarico-de-papo-vermelho
<i>Calidris minutilla</i>	maçariquinho
<i>Calidris pusilla</i>	maçarico-rasteiro
<i>Calidris ruficollis</i>	maçarico-de-pescoço-vermelho
<i>Charadrius collaris</i>	batuíra-de-coleira
<i>Charadrius semipalmatus</i>	batuíra-de-bando
<i>Chroicocephalus brunnicephalus</i>	gaivota-do-Índico
<i>Chroicocephalus genei</i>	gaivota-de-bico-fino
<i>Chroicocephalus novaehollandiae</i>	gaivota-prata
<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	gaivota-de-cabeça-preta
<i>Geochelidon nilotica</i>	gaivina-de-bico-preto
<i>Haematopus palliatus</i>	piru-piru
<i>Larus argentatus</i>	gaivota-prateada
<i>Larus dominicanus</i>	gaivotão
<i>Larus fuscus</i>	gaivota-de-asa-escura

<i>Larus ichthyaetus</i>	gaivotão-de-cabeça-preta
<i>Limosa lapponica</i>	fuselo
<i>Larus melanocephalus</i>	gaivota-do-Mediterrâneo
<i>Larus pipixcan</i>	gaivota-de-Franklin
<i>Larus vagae</i>	gaivota-da-Mongólia
<i>Limnodromus griseus</i>	maçarico-de-costas-brancas
<i>Numenius madagascariensis</i>	maçarico-siberiano
<i>Numenius phaeopus</i>	maçarico-galego
<i>Rynchops niger</i>	talha-mar
<i>Scolopax rusticola</i>	galinhola
<i>Sterna hirundo</i>	trinta-réis-boreal
<i>Sterna paradisaea</i>	trinta-réis-do-Ártico
<i>Thalasseus sandvicensis</i>	trinta-réis-de-bando
<i>Tringa melanoleuca</i>	maçarico-grande-de-perna-amarela
<i>Tringa totanus</i>	maçarico-de-perna-vermelha

Coraciiformes

<i>Ceryle torquatus</i>	martim-pescador-grande
-------------------------	------------------------

Passeriformes

<i>Conirostrum bicolor</i>	figuinha-do-mangue
<i>Hirundo rustica</i>	andorinha-das-chaminés

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	28
2.1	INFLUENZA AVIÁRIA	28
2.1.1	Classificação	28
2.1.2	Histórico dos principais eventos	29
2.1.3	Características estruturais e genéticas.....	32
2.1.4	Ciclo viral.....	34
2.1.4.1	Adesão e endocitose.....	35
2.1.4.2	Escape do endossomo e “desempacotamento”	36
2.1.4.3	Transcrição.....	36
2.1.4.4	Tradução e síntese protéica	36
2.1.4.5	Replicação.....	37
2.1.4.6	“Empacotamento” e liberação.....	37
2.1.5	Patogenicidade e determinantes de virulência	39
2.1.6	Sinais clínicos.....	40
2.1.7	Epidemiologia	41
2.1.8	Prevenção e controle	42
2.1.9	Diagnóstico.....	43
2.1.9.1	Testes diagnósticos diretos.....	44
2.1.9.2	Provas de caracterização viral.....	46
2.1.9.3	Testes diagnósticos indiretos	48
2.2	AVES MIGRATÓRIAS	49
2.2.1	Rotas migratórias.....	49
2.2.2	Espécies	52
2.3	INFLUENZA EM ANSERIFORMES E CHARADRIIFORMES	54
2.3.1	Anseriformes.....	57
2.3.2	Charadriiformes.....	60
2.4	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SAÚDE PÚBLICA.....	63
3	OBJETIVOS.....	66
3.1	GERAL	66
3.2	ESPECÍFICOS	66

4	MATERIAL E MÉTODOS.....	67
4.1	EXPEDIÇÕES CIENTÍFICAS.....	67
4.2	CAPTURE, MANEJO E COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	68
4.3	ANÁLISES LABORATORIAIS.....	70
4.3.1	Extração do material genético viral	71
4.3.1.1	QIAamp® Viral RNA Mini Kit.....	71
4.3.1.2	5X MagMAX™ 96 Viral Isolation Kit.....	72
4.3.2	Deteção viral	73
4.3.3	Isolamento viral.....	73
4.3.4	Reação de hemaglutinação	74
4.3.5	Reação de inibição da hemaglutinação	76
4.3.6	Reação de inibição da neuraminidase	77
4.3.7	Sequenciamento genético.....	79
4.3.7.1	RT-PCR.....	80
4.3.7.2	Purificação do DNA.....	81
4.3.7.3	Sequenciamento genético.....	81
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	83
5	RESULTADOS.....	85
5.1	DETECÇÃO VIRAL	85
5.2	ISOLAMENTO E SOROTIPAGEM VIRAL.....	89
5.3	SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.....	90
6	DISCUSSÃO.....	94
7	CONCLUSÃO	101
	REFERÊNCIAS	102

1 INTRODUÇÃO

A gripe, em seres humanos, é uma doença respiratória aguda de alta morbidade, causada pelos vírus da influenza, que acomete os tratos respiratórios inferior e superior. Em todo o mundo, mais de 600 milhões de pessoas são infectadas anualmente; destas, entre 300.000 e 500.000 vão à óbito em decorrência das complicações causadas pela doença (GERDIL, 2003; KATZ, 2009). Apesar de existirem três tipos de vírus da influenza (A, B e C), o A é considerado o mais importante devido às relevantes epidemias e pandemias causadas e capacidade de infectar diferentes espécies (HILLEMANN, 2002; SUAREZ, 2008).

Os vírus da influenza aviária, ou vírus da influenza A (AIV, sigla em inglês para *Avian Influenza Viruses*), são classificados de acordo com suas glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). A recombinação entre os diferentes tipos de HA e NA fazem com que os AIV tenham uma grande diversidade genética (FOUCHIER et al., 2007).

Apesar da ocorrência de epidemias e pandemias, os vírus da influenza não estão restritos à espécie humana e são capazes de causar debilidade ou mortalidade em várias outras, incluindo equinos, suínos, mamíferos marinhos e aves (WEBSTER et al., 1992). Nas aves, a importância se torna realmente visível quando ocasiona surtos com substancial prejuízo econômico ou quando os vírus de origem aviária passam a acometer humanos (WEBBY; WEBSTER, 2003). Por exemplo, a etiologia da pandemia de 1968 (“Gripe de Hong Kong”), a qual levou à óbito cerca de meio milhão de pessoas, foi atribuída a uma estirpe que continha genoma recombinante dos vírus da influenza de aves e de humanos. Assim, os vírus da influenza A podem ser responsáveis pelo surgimento de pandemias ao redor do mundo (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001).

A diversidade genética destes vírus e a sua existência em reservatórios silvestres qualificaram a influenza aviária como uma doença não-erradicável do ponto-de-vista epidemiológico, tornando-se uma constante ameaça à Saúde Pública (WEBSTER, 1998).

O contato entre aves de vida livre e aves de produção pode ser determinante para ocorrência de surtos nas espécies comerciais e, assim, medidas de biossegurança em granjas são de extrema importância (SALOMON; WEBSTER, 2009). Além disso, existe a preocupação com a possibilidade de transmissão viral também aos seres humanos, como já foi observado em países asiáticos durante as epidemias em 1918 e em 1957 (WHO, 2009).

As aves pertencentes às ordens Anseriformes (cisnes, gansos, patos e marrecos), seguidas pela Charadriiformes (gaivotas, trinta-réis, maçaricos e batuíras), são as que possuem a maior ocorrência e diversidade de subtipos dos AIV (WARD et al., 2009). O comportamento migratório de grande parte destas aves pode favorecer a disseminação de patógenos através de longas distâncias, colocando em risco populações de outras espécies de aves (em vida livre ou cativeiro) e mamíferos, incluindo humanos (TAKEKAWA et al., 2010). Diferentes áreas ao norte do Brasil são consideradas portas-de-entrada dos migrantes setentrionais no país; a Amazônia e a zona costeira da região Norte e Nordeste são locais com muitos registros de espécies migratórias provenientes do Hemisfério Norte (NUNES et al., 2006).

Através do monitoramento dos vírus nas aves silvestres, é possível obter informações dos subtipos de AIV prevalentes nas populações de aves, bem como suas características patogênicas e antigênicas, visando a identificação precoce de subtipos com capacidade de gerar epidemias e pandemias. O monitoramento permite, ainda, elaborar painéis de amostras de referência que poderão ser utilizados na fabricação de vacinas para eventuais epidemias/pandemias em humanos por vírus de origem aviária (SOARES et al., 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLUENZA AVIÁRIA

O termo influenza surgiu em 1580, na Itália; foi originado da palavra em latim *influentia*, pois acreditava-se que os sintomas de febre, tosse e calafrio eram decorrentes de “influências planetárias” (POTTER, 1998, 2001; VALDEZ, 2002).

2.1.1 Classificação

Segundo a classificação de Baltimore, os vírus da influenza aviária pertencem ao Grupo V, por armazenar seu código genético em fita simples de ácido ribonucléico com polaridade negativa [(-)ssRNA] (BALTIMORE, 1971).

Os vírus da influenza não estão atribuído a uma ordem; pertencem à família *Orthomyxoviridae*, que é composta por seis gêneros: *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C*, *Isavirus*, *Quaranjavirus* e *Thogotovirus* (ICTV, 2013). Todos os gêneros possuem apenas uma espécie cada, exceto *Quaranjavirus* e *Thogotovirus*. Os vírus influenza do tipo A e B causam um amplo espectro de doenças, incluindo sintomatologia respiratória do trato inferior e pneumonia (no caso do tipo A, também pode ocorrer encefalopatia). Por outro lado, infecções associadas ao vírus tipo C são limitadas ao trato respiratório superior e, na maioria das vezes, assintomáticas (MURPHY; WEBSTER, 1996; NICHOLSON, 1998). O gênero *Isavirus* inclui apenas o vírus da anemia infecciosa do salmão (RÁCZ, 2008a). Os gêneros *Quaranjavirus* e *Thogotovirus* incluem duas espécies cada, que são transmitidas aos vertebrados através de carrapatos (SUAREZ, 2008; PRESTI et al., 2009).

Os subtipos virais do tipo A são classificados de acordo com as características sorológicas de suas duas glicoproteínas de superfície: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Classicamente são reconhecidos 16 subtipos de HA, denominados de H1, H2, H3 até H16 e nove subtipos de NA, denominados de N1, N2, N3 até N9 (WEBSTER et al., 1997; FOUCHIER et al., 2005). Todos os vírus da influenza aviária são classificados como tipo A (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001).

Recentemente descobriu-se dois novos subtipos de HA e NA; denominados H17 e N10, foram encontrados apenas em morcegos (Mammalia: Chiroptera). Estudos filogenéticos demonstraram tratar-se de uma linhagem bastante divergente das glicoproteínas conhecidas até o momento. Apesar de não haver evidência de ligação eficiente do H17 e N10 com células humanas ou aviárias, a possibilidade de os morcegos atuarem como reservatórios de infecção ou permitirem o rearranjo viral entre os vírus da influenza A não está descartada (GARCÍA-SASTRE, 2012; LI et al., 2012; TONG et al., 2012; SUN et al., 2013).

A nomenclatura utilizada para descrever os vírus da influenza segue os padrões propostos pela OMS (Organização Mundial da Saúde) (WHO, 1980). O nome do vírus é composto de informações separadas por barras verticais, que incluem respectivamente: tipo (A, B ou C), espécie animal, localização geográfica, número de referência do laboratório, ano de isolamento, e a descrição antigênica de HA e NA entre parênteses (no caso do tipo A). Por exemplo, um vírus da influenza A isolado em peru no estado de Missouri, Estados Unidos, deverá ser classificado como: A/turkey/Missouri/24093/1999/(H1N2). Quando o vírus é de origem humana, a informação sobre a espécie não é inclusa na nomenclatura, como por exemplo: A/HongKong/156/1997/(H5N1) (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SUAREZ, 2008).

2.1.2 Histórico dos principais eventos

Apesar de existirem poucos relatos sobre epidemias de influenza na literatura antiga, a síndrome gripal em seres humanos é conhecida por ocasionar surtos desde 2000 a.C. A primeira descrição científica sobre a doença foi feita em 412 a.C. pelo médico e filósofo grego Hipócrates, que relatou a presença de uma enfermidade respiratória aguda que acometeu o exército ateniense e desapareceu subsequentemente. O primeiro relato oficial de uma epidemia, na qual os sintomas foram, provavelmente, provocados pelos vírus da influenza, ocorreu em 1173 d.C. (POTTER, 1998, 2001).

Em 1580 houve o primeiro de relato de uma doença respiratória aguda com características típicas de propagação intercontinental, ou seja, de uma pandemia. Essa pandemia teve origem no continente asiático durante o verão e alastrou-se para África, Europa e mais dois países da Ásia (PYLE, 1986). Toda a Europa foi atingida em um período de seis

meses, sendo também disseminada para a América. Mais de 8.000 óbitos foram declarados em Roma e algumas cidades espanholas foram dizimadas (BEVERIDGE, 1991).

No século XVIII, duas importantes pandemias foram relatadas. A primeira delas teve início na Rússia em 1729, e disseminou-se por toda a Europa em 6 meses (PYLE, 1986). Nos anos de 1781 e 1782, cerca de 30 mil pessoas foram infectadas durante uma pandemia que teve início na China e disseminou-se pela Europa em 8 meses, totalizando mais de 10 milhões de pessoas acometidas. Relatos da época descreveram que a parcela mais afetada da população foram os adultos jovens (POTTER, 2001).

O primeiro isolamento viral de um AIV ocorreu em 1902 em amostras provenientes de galinhas na Itália, e a estirpe altamente patogênica H7N7 estava envolvida. Acredita-se que este mesmo subtipo causou a doença conhecida como “peste aviária”, que surgiu em 1878 (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001).

A pandemia mais devastadora de que se tem notícia, a “Gripe Espanhola”, ocorreu em 1918. Ficou conhecida como “o maior holocausto médico da História”, pois infectou aproximadamente 50% da população mundial e causou mortalidade de mais de 50 milhões de pessoas. Fragmentos de tecido pulmonar das vítimas que vieram a óbito pela doença foram preservados e, em 1997, foi possível a identificação do vírus da influenza A subtipo H1N1 através do sequenciamento genéticos destas amostras (TAUBENBERGER et al., 1997, 2001; POTTER, 2001).

Em 1933 ocorreu o primeiro isolamento viral de um vírus da influenza em humanos; durante uma epidemia no Reino Unido, os lavados traqueais de pessoas infectadas foram inoculados de forma intranasal em furões (*Mustela putorius furo*), que apresentaram resultados positivos através do teste de vírus neutralização (SMITH et al., 1933).

A “Gripe Asiática”, causada pelo subtipo H2N2, teve seu início em 1957 na China e rapidamente se espalhou para outros países, causando a morte de mais de um milhão de pessoas. Já a “Gripe de Hong Kong” (H3N2), em 1968, matou cerca de meio milhão de pessoas (SALOMON; WEBSTER, 2009).

Entre 1997 e 1998, 18 pessoas foram infectadas com o vírus da influenza A H5N1 na cidade de Hong Kong, resultando em seis óbitos. Este vírus não provocou uma epidemia ou pandemia devido à sua baixa capacidade de se transmitir de uma pessoa a outra. A “Gripe do Frango”, como ficou conhecida, ocorreu devido ao vírus H5N1 ter sido transmitidos diretamente de frangos infectados às pessoas e por ser uma estirpe altamente patogênica para galinhas (KATZ, 2003).

Em março de 1999, mais um subtipo viral relacionado à influenza A infectou seres humanos em Hong Kong. Identificado como H9N2, o vírus causou apenas quadros brandos de gripe e não foi eficiente na transmissão de uma pessoa para outra, sendo transmitido de aves domésticas diretamente para seres humanos. No entanto, posteriormente foi verificado que esta linhagem viral sofreu recombinação e atuou como doadora de genes para proteínas internas do vírus H5N1 (KATZ, 2003).

Em fevereiro de 2003, novamente na cidade de Hong Kong, três adultos da mesma família foram hospitalizados devido a uma doença respiratória severa não-identificada. Destes, dois foram a óbito poucos dias após hospitalização. Quando o vírus da influenza H5N1 foi isolado nestes pacientes, a OMS entrou em estado de alerta para pandemias (WHO, 2003a). Assim, esta estirpe que reemergiu na China se espalhou por muitas partes do mundo, causando enorme impacto econômico na indústria avícola. Entre janeiro de 2003 a outubro de 2013, a OMS registrou 641 casos humanos confirmados para o H5N1 em 15 países, principalmente na Ásia, mas também na África e Oceania. Destes casos, 380 pessoas vieram a óbito devido a infecção por esta estirpe. De janeiro a outubro de 2013, seis países (Egito, Bangladesh, China, Camboja, Vietnã e Indonésia) confirmaram casos humanos de H5N1, totalizando 31 casos e 20 mortes (WHO, 2013a). Entre 2003 e 2009, o subtipo H5N1 também foi confirmado em aves de produção em 50 países na Europa, Ásia e África; no mesmo período, houveram registros desta estirpe em aves silvestres na Áustria, Bósnia e Herzegovina, Croácia, Eslováquia, Eslovênia, Espanha, Geórgia, Grécia, Itália, Mongólia e Suíça (OIE, 2009a,b).

Em março de 2003, outra situação alarmante ocorreu na Europa, quando uma estirpe de influenza A H7N7 disseminou-se em aves de produção na Holanda. Este subtipo viral, que ainda não havia sido encontrado em seres humanos no país, foi detectado em 89 pessoas. Os trabalhadores envolvidos na eliminação dos animais contaminados começaram a exibir sintomas de conjuntivite viral. Duas pessoas desenvolveram um quadro respiratório com sintomatologia característica de gripe, e uma veio a óbito devido a complicações pulmonares. A estirpe H7N7 isolada nestes pacientes possuía algumas características distintas: era capaz de se replicar na conjuntiva humana e também de se transmitir diretamente entre humanos. Testes sorodiagnósticos efetuados em rebanhos suínos da mesma região demonstraram evidências de exposição viral ao H7N7. Assim que um médico veterinário morreu de infecção respiratória, a OMS novamente reconheceu a presença de uma severa ameaça (WHO, 2003b; FOUCHIER et al., 2004).

Em 26 de abril de 2009, foram diagnosticados no México e nos Estados Unidos os primeiros casos de uma doença que se tornaria uma das grandes preocupações mundiais. Inicialmente chamado de “Gripe Suína”, o vírus da influenza A subtipo H1N1 se propagou por mais de 30 países durante as primeiras semanas de vigilância epidemiológica. Em 11 de junho de 2009, a OMS classificou a “Gripe Suína” como uma pandemia, devido à constatação de surtos significativos com transmissão sustentada humano-a-humano em mais de uma das seis regiões monitoradas pela Organização. Até 1º de agosto de 2010, o vírus H1N1 já havia sido confirmado em mais de 214 países de cinco continentes, totalizando 18.449 óbitos (WHO, 2010a), comprovando o seu potencial para originar a primeira pandemia de gripe do século XXI (SMITH et al., 2009). Segundo a OMS, esta estirpe viral se disseminou em velocidade sem precedentes pelo mundo: registros anteriores demonstram que outros vírus da gripe demoraram mais de 6 meses para propagar com a mesma intensidade, enquanto a nova estirpe do subtipo H1N1 desenvolveu tal capacidade em menos de 6 semanas (WHO, 2009). Apenas em 10 de agosto de 2010, foi anunciado pela OMS que esta estirpe já se encontrava em período pós-pandêmico (WHO, 2010b).

O vírus da influenza A H7N9 é comumente encontrado em aves e não havia sido observado em humanos. Em março de 2013, a China relatou três casos confirmados de infecção respiratória grave causada por este subtipo em humanos. Até meados de outubro de 2013, foram confirmados 136 casos, dos quais 45 resultaram em óbito (WHO, 2013b). A maioria dos pacientes tinha histórico de exposição recente às aves de produção, principalmente galinhas, dos mercados para comércio de animais (conhecidos como *live animals markets*). Estudos prévios já haviam demonstrado a presença desta estirpe em aves domésticas nestes tipos de mercado na China; investigações epidemiológicas demonstraram que, apesar de não haver transmissão sustentada de humano-a-humano, esta forma de transmissão não está totalmente excluída (BAO et al., 2013).

2.1.3 Características estruturais e genéticas

Por microscopia eletrônica, os vírus da influenza A apresentam morfologia esférica, pleomórfica ou filamentosa com 80 a 120 nm de diâmetro. A composição viral é de 1% de RNA, 70% de proteínas, 20% de lipídeos e 9% de carboidratos (MURPHY; WEBSTER,

1996). A partícula viral possui nucleocápside de simetria helicoidal e é envolta por um envelope lipídico proveniente do rompimento da membrana plasmática da célula hospedeira (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001), além de um genoma com oito segmentos de RNA de fita simples (denominado vRNA) e polaridade negativa (ou seja, complementar ao RNA mensageiro) (HAY, 1998; BOUVIER; PALESE, 2008) (Figura 1).

Os segmentos de vRNA 1, 2 e 3 codificam respectivamente as proteínas PB2 (*polymerase basic protein 2*), PB1 (*polymerase basic protein 1*) e PA (*polymerase acidic protein*), que compõem a polimerase viral e possuem atividade de transcriptase (NAKAGAWA et al., 1996; HAY, 1998). O segmento 4 codifica a glicoproteína HA (*hemagglutinin*), que se insere no envelope lipídico e está relacionada à adesão e invasão celular (SKEHEL; WILEY, 2002). O segmento 5 codifica a proteína NP (*nucleoprotein*), relacionada à estabilização e proteção do vRNA. O segmento 6 codifica a glicoproteína NA (*neuraminidase*), também inserida no envelope lipídico e cuja função é facilitar o acesso da partícula viral à superfície celular (HILLEMAN, 2002). O segmento número 7 codifica as proteínas M1 (*matrix protein 1*), integrante da matriz protéica viral, e M2 (*membrane ion channel protein*), atuante no “desempacotamento” do vírus (MOULD et al., 2000). O segmento 8 codifica duas proteínas: a NS1 (*nonstructural protein 1*), que é única proteína não-estrutural dos vírus da influenza A e tem função de inibir a síntese de proteínas antivirais; e a NEP (*nuclear export protein*), também conhecida como NS2 (*nonstructural protein 2*), que intermedia a exportação nuclear dos RNAs do vírion (O’NEILL et al., 1998; CHEN; KRUG, 2000). Em suma, dez proteínas são codificadas pelo genoma do vírus da influenza A (Quadro 1) (NEUMANN et al., 2000).

Cada segmento de vRNA apresenta suas extremidades em forma de “grampo helicoidal” (*helical hairpin*), que são ligadas ao complexo de RNA polimerases (proteínas PA, PB1 e PB2), enquanto o restante do segmento é coberto pela proteína NP. As regiões codificadoras de proteínas encontram-se na porção central do segmento de vRNA; já as extremidades destes segmentos possuem regiões não-codificadoras altamente conservadas que atuam como promotores da replicação e transcrição do vRNA, além dos mecanismos de sinalização por poliadenilação e “empacotamento” viral (SUAREZ, 2008).

Figura 1 - Ilustração da estrutura do vírus da influenza A

Fonte: Smith et al. (2009), adaptação de Hurtado (2013)

Quadro 1 - Organização do genoma do vírus da influenza A

Segmento viral	Tamanho do segmento (pb)	Proteína codificada	Peso molecular da proteína (Da)
1	2341	PB2	85.700
2	2341	PB1	86.500
3	2233	PA	84.200
4	1778	HA	61.500
5	1565	NP	56.100
6	1413	NA	50.000
7	1027	M1	27.800
		M2	11.000
8	890	NS1	26.800
		NEP	14.200

Fonte: Newmann et al. (2000), adaptação de Hurtado (2013)

2.1.4 Ciclo viral

O ciclo viral é compreendido por seis fases: adesão e endocitose, escape do endossomo e “desempacotamento”, transcrição, tradução e síntese protéica, replicação, e “empacotamento” e liberação (Figura 2) (SUAREZ, 2008).

2.1.4.1 Adesão e endocitose

O primeiro estágio do ciclo viral é a ligação entre a glicoproteína HA e o receptor de ácido siálico na superfície da célula do hospedeiro. Esta ligação permite a fusão da partícula viral com a membrana endossômica e, conseqüentemente, o acesso viral ao citoplasma celular por endocitose (SKEHEL; WILEY, 2002).

Ácido siálico é um termo geral para designar açúcares derivados de ácido neuramínico que se localizam na porção terminal de glicoproteínas de membrana. As moléculas de ácido siálico são frequentemente classificadas de acordo com suas ligações carbônicas do tipo α -2 aos açúcares adjacentes. As ligações mais comuns são as α -2,3 e as α -2,6, que resultam em diferentes conformações dos receptores do hospedeiro, afetando também a ligação do vírus à célula. A HA viral, de acordo com sua sequência de aminoácidos, pode ter especificidade tanto pelas ligações α -2,3 quanto pelas α -2,6 (ITO et al., 2000; SUAREZ, 2008).

A conformação e distribuição do ácido siálico nos tecidos podem contribuir para a especificidade do hospedeiro, podendo afetar diretamente a patogênese da doença entre as espécies (ITO et al., 2000; SUAREZ, 2008). Diferentes espécies animais possuem diferentes padrões teciduais e níveis de expressão de ácidos siálicos α -2,3 e α -2,6. As ligações α -2,3 são tipicamente as mais comuns em aves, enquanto as ligações α -2,6 são predominantes em humanos. Os suínos, por outro lado, possuem altos níveis de receptores de ácido siálico α -2,3 e α -2,6 em suas células do epitélio respiratório, o que os torna particularmente suscetíveis a infecção tanto dos vírus da influenza adaptados às aves quanto daqueles adaptados aos humanos (HINSHAW et al., 1981; BEARE; WEBSTER, 1991).

2.1.4.2 Escape do endossomo e “desempacotamento”

Após a endocitose, a acidez do endossomo induz a formação de canais iônicos pela proteína M2 da partícula viral, permitindo a entrada de íons H^+ através do envelope viral ao interior do vírion. Com a redução do pH, a glicoproteína HA sofre uma mudança de conformação e induz a fusão da membrana; ao mesmo tempo, ocorre a quebra das ligações protéicas da matriz (dissociação da proteína M1), liberando o vírion no citoplasma celular (MOULD et al., 2000; HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SUAREZ, 2008).

2.1.4.3 Transcrição

Após o “desempacotamento” viral, as proteínas PB1, PB2 e PA são transportadas ao núcleo ativamente pela NP, que possui um localizador de sinal nuclear (*nuclear localization signal*) cujo mecanismo de atuação ainda é pouco compreendido (NAKAGAWA et al., 1996; HAY, 1998; SUAREZ, 2008). A NP e o complexo de RNA polimerases (PB1, PB2 e PA) iniciam o processo de transcrição dentro do núcleo celular, transcrevendo o vRNA (polaridade negativa) em RNA mensageiro (mRNA; polaridade positiva) (BOUVIER; PALESE, 2008). Além das RNAs polimerases virais, o vírus também pode utilizar a RNA polimerase II da célula hospedeira neste processo de síntese de mRNA. Para dar início a esse processo transcrição, no entanto, se faz necessária a captura de fragmentos de mRNA do hospedeiro para serem utilizados como primers, em um processo denominado *cap snatching* que é intermediado pela PB2. Enquanto os segmentos 1 a 6 do vRNA são prontamente transcritos, os segmentos 7 e 8 passam por um processo de *splicing*, no qual são divididos em dois fragmentos cada; estes fragmentos codificarão as proteínas M1, M2, NS1 e NEP (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001).

2.1.4.4 Tradução e síntese protéica

Subsequentemente, os mRNAs migram ao citoplasma e utilizam a maquinaria da célula hospedeira para promover a síntese das proteínas virais. Enquanto as proteínas M1, NS1 e NEP acumulam-se no citoplasma, as PB1, PB2, PA e NP migram ao núcleo e retroalimentam o processo de transcrição. As proteínas M1 e NEP são críticas para intermediar o fluxo das proteínas do citoplasma ao núcleo e vice-versa. Por outro lado, as proteínas HA, NA e M2 prosseguem ao retículo endoplasmático rugoso e ao Complexo de Golgi, onde sofrerão um processo de glicosilações e *folding* e serão, então, integradas à membrana plasmática da célula hospedeira por exocitose (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SUAREZ, 2008).

2.1.4.5 Replicação

O acúmulo de NP no núcleo celular estimula uma transição no processo de transcrição, de modo que o complexo de RNA polimerases passa a realizar a transcrição do vRNA em RNA complementar (cRNA; polaridade positiva). O cRNA, por sua vez, serve como molde para a síntese de novos vRNAs, completando assim a replicação do material genético viral. O vRNA recém-sintetizado liga-se à NP e é transportado ao citoplasma para a etapa de “empacotamento” viral (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SUAREZ, 2008).

2.1.4.6 “Empacotamento” e liberação

O processo de “empacotamento” viral é mediado principalmente pela M1, que intermedia a formação do vírion, a agregação dos segmentos de vRNA e a ligação do envelope viral. Todos os segmentos de vRNA possuem regiões altamente conservadas de 12 ou 13 nucleotídeos em cada uma de suas extremidades, que servem como sinalizadores para o processo de “empacotamento”. Mesmo assim, no entanto, é sabido que o processo de

“empacotamento” de vRNA é altamente ineficiente e muitas das partículas virais não terão todos os oito segmentos, sendo produzidas uma alta proporção (mais de 90%) de partículas virais ineficientes. Além disso, também pode ocorrer o “empacotamento” de cópias múltiplas de um mesmo segmento, particularmente dos segmentos menores. A glicoproteína NA tem um papel crítico na formação do envelope através de sua atuação como sialidase, isto é, sua atividade de remoção dos radicais de ácido siálico das glicoproteínas de membrana da célula hospedeira. Através da eliminação destes radicais, evita-se que a HA promova a aglutinação entre partículas virais, garantindo que estas se formem adequadamente e sejam liberadas (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SUAREZ, 2008).

Figura 2 - Representação esquemática do ciclo do vírus da influenza A, demonstrando as fases de adesão, endocitose, escape do endossomo, “desempacotamento”, transcrição, tradução, síntese protéica, replicação, “empacotamento” e liberação

Fonte: von Itzstein (2007), adaptação de Hurtado (2013)

2.1.5 Patogenicidade e determinantes de virulência

De forma geral, a OMS classifica os vírus da influenza aviária em dois tipos: Vírus da Influenza Aviária Altamente Patogênicos (HPAI, sigla em inglês para *Highly Pathogenic Avian Influenza*) e Vírus Influenza Aviária Pouco Patogênicos (LPAI, sigla em inglês para *Low Pathogenic Avian Influenza*) (WHO, 1980; ALEXANDER, 2007). Por definição, são considerados HPAI as estirpes que possuem um Índice de Patogenicidade Intravenosa (IVPI, sigla em inglês para *Intravenous Pathogenicity Index*) superior a 1.2 quando testados em galinhas com 6 semanas de vida, ou quando causam mortalidade igual ou superior a 75% em galinhas com 4 a 8 semanas de vida infectadas pela forma intravenosa. Além disso, também podem ser consideradas HPAI as estirpes dos subtipos H5 e H7 cujo sítio de clivagem da hemaglutinina apresente uma sequência de aminoácidos semelhante àquela de estirpes previamente classificadas como HPAI. Os H5 e H7 que não se encaixarem nestes critérios serão denominados Vírus da Influenza Notificável de Baixa Patogenicidade (LPNAI, sigla em inglês para *Low Pathogenicity Notifiable Avian Influenza*). Por fim, são considerados LPAI todos os subtipos de vírus da influenza A que não se enquadrarem nos critérios para serem classificados como HPAI ou LPNAI (SUAREZ, 2008).

A hemaglutinina é a principal determinante de virulência dos AIV, sendo que três características estruturais desta glicoproteína são consideradas determinantes: (i) sítio de ligação ao receptor celular, (ii) presença de quatro ou mais áreas antigênicas para auxiliar no escape ao sistema imune, e (iii) sítio de clivagem proteolítica. O sítio de clivagem proteolítica (PCS, sigla em inglês para *Proteolytic Cleavage Site*) constitui uma região de terminal carboxílico que, sob ação de proteases, resulta na separação da HA em dois fragmentos: HA₁ e HA₂. Alterações neste PCS, seja por mutação ou por inserção de aminoácidos básicos, podem resultar em maior suscetibilidade à clivagem e, consequentemente, em maior capacidade de replicação em uma ampla gama de tecidos, aumentando a virulência (SUAREZ, 2008).

Drift antigênico e *shift* antigênico são os dois principais mecanismos responsáveis pela mudança contínua na antigenicidade dos vírus da influenza A. O *drift* antigênico é produzido por mutações pontuais e cumulativas nos genes que codificam os dois antígenos de superfície, HA e NA (ZAMBON, 1999). A alteração de um único aminoácido em HA pode permitir ao vírus mutante escapar à neutralização dos anticorpos gerados pelo hospedeiro em infecções

anteriores, resultando em uma variante capaz de provocar doenças e, até mesmo, epidemias na população (NAKAJIMA et al., 2000). Já o *shift* antigênico pode ser definido como o aparecimento de um vírus da influenza contendo um novo subtipo de HA ou de HA/NA, os quais são imunologicamente distintos dos vírus da influenza que circulavam anteriormente na população (WEBSTER et al., 1992; ZAMBOM, 1999; SUAREZ, 2008).

Evidências sugerem que o aparecimento de linhagens pandêmicas pode ocorrer por dois mecanismos de *shift* distintos. O primeiro é derivado da natureza segmentada do genoma dos vírus influenza e refere-se ao reagrupamento dos segmentos genômicos dos vírus influenza humana e influenza animal durante a co-infecção de uma mesma célula hospedeira (WEBSTER et al., 1992; ZAMBOM, 1999; SUAREZ, 2008). O segundo mecanismo para o surgimento de linhagens pandêmicas é a transmissão direta de uma linhagem animal para o homem (COX; SUBBARAO, 2000).

2.1.6 Sinais clínicos

Após a exposição ao vírus, o período de incubação da infecção pode variar entre algumas horas, no caso de aves inoculadas experimentalmente, e até três dias em aves naturalmente infectadas (SWAYNE, 2008a). Em aves, os sinais clínicos são amplamente variáveis e dependem de muitos fatores, como subtipo viral, espécie infectada, idade, infecções concomitantes, *status* imunológico e fatores ambientais (SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2008).

Os LPAI geralmente não causam sintomatologia em aves silvestres. Em galinhas e perus estes vírus apresentam alta morbidade (>50%) e baixa mortalidade (<5%), mas a taxa de mortalidade pode ser bastante alta quando associada a infecções secundárias. Nestas aves, as lesões em tratos respiratório, digestivo, urinário e reprodutivo permitem a observação de sinais clínicos, como: lacrimejamento excessivo, tosse, secreção nasal, diarreia, queda na produção de ovos, penas eriçadas, apatia e diminuição no consumo de água e alimentos (SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2008; CAPUA; TERREGINO, 2009). Do ponto-de-vista comercial, estas infecções não devem ser ignoradas, pois normalmente causam expressiva queda nos índices produtivos (ALEXANDER, 2000; SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2008; CAPUA; TERREGINO, 2009).

Os HPAI normalmente causam doença sistêmica severa com alta mortalidade, tanto em aves silvestres quanto domésticas (ALEXANDER, 2007). Em galinhas e perus é possível observar lesões principalmente em sistemas cardiovascular, nervoso e tegumentar. Na forma hiperaguda da doença, as aves podem vir a óbito subitamente ou apresentando sinais clínicos não-específicos (apatia, desidratação, anorexia, diarreia, queda brusca na produção de ovos). Caso a doença não seja hiperaguda, é comum a manifestação de sintomatologia nervosa, como tremores de cabeça e pescoço, dificuldade para manter-se em pé, torcicolo, opistótono, nistagmo, convulsão, tremores, incoordenação motora e paralisia em asas. Entretanto, o tipo dos sinais clínicos podem variar de acordo com o subtipo do vírus e a espécie de ave envolvidos (PHILIPPA, 2008; SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2008).

Em humanos, os sintomas também são inespecíficos, como febre alta, calafrios, dores de cabeça, mialgia, tosse seca e diarreia. Sintomas neurológicos (*e.g.*, encefalite), cardíacos e renais são pouco frequentes (HILLEMAN, 2002).

2.1.7 Epidemiologia

A epidemiologia da influenza aviária depende de interações entre o vírus, o hospedeiro e o ambiente. Compreender este conceito é importante para entender não apenas a epidemiologia da doença, mas também os potenciais impactos associados à introdução de novas estirpes virais em uma população (STALLKNECHT; BROWN, 2007).

Apesar de o contágio direto ser a principal forma de transmissão dos AIV, uma vez que aves infectadas podem liberar altas concentrações de vírus no ambiente através de secreções respiratórias, conjuntivais e/ou fezes, o contágio indireto pelas vias de transmissão aerógena, por água e por fômites contaminados também são bastante relevantes (STURM-RAMIREZ et al., 2005; SWAYNE, 2008a).

Em relação às aves aquáticas, sabe-se que o mecanismo de transmissão oro-fecal é fundamental para manutenção do vírus no ambiente (YEWDELL; GARCÍA-SASTRE, 2002; STALLKNECHT; BROWN, 2008); os patos e marrecos são considerados fundamentais neste processo por eliminarem grande volume de fezes com alta concentração viral (WEBSTER et al., 1978). A prevalência dos AIV e dos subtipos encontrados nas populações de aves silvestres podem variar consideravelmente de acordo com a espécie, época do ano e a

localidade, pois as aves exibem diferentes comportamentos e preferências de habitat (STALLKNECHT; BROWN, 2007). Por exemplo, a maior frequência de AIV em patos normalmente ocorre no final do verão e início do outono, e tem sido associado ao período que antecede à migração (HINSHAW et al., 1985; STALLKNECHT; BROWN, 2007).

A possibilidade de haver transmissão vertical ainda é discutida e não está totalmente elucidada. Tanto nos casos de HPAI como de LPAI, a produção de ovos é geralmente cessada ou reduzida, diminuindo o potencial de transmissão vertical dos AIV. Além disso, galinhas infectadas com HPAI apresentam infecção sistêmica severa e morte do embrião; portanto, raramente um ovo eclodirá gerando um embrião viável (SWAYNE, 2008b).

Estudos experimentais acerca dos fatores químicos, biológicos e físicos que possam determinar a persistência ambiental dos AIV ainda são necessários para validar algumas observações em condições de campo (STALLKNECHT et al., 2010). Por exemplo, dois fatores complexos que ocorrem em meio ambiente e que são de grande importância em relação à eliminação e persistência viral, são: quantidade de radiação ultravioleta e quantidade de matéria orgânica que acompanha o vírus. Em uma pesquisa sobre a estabilidade ambiental dos vírus da influenza A realizado por Webster et al. (1978), uma estirpe H3N6 persistiu por 32 dias em água proveniente de rio. Outros autores demonstraram que tanto a persistência quanto a efetividade viral estão intimamente relacionadas ao pH, salinidade e temperatura da água (STALLKNECHT et al., 1990a; BROWN et al., 2007, 2009). Em um exemplo extremo, uma estirpe H6N2 perdurou por 100 dias em água a 17°C, com pH 8.2 e sem salinidade (0 ppt) (STALLKNECHT et al., 1990a).

2.1.8 Prevenção e controle

Procedimentos adequados de descontaminação são bastante eficientes na prevenção e controle dos AIV, uma vez que estes são facilmente inativados devido à presença de envelope lipoprotéico (BIRNBAUM; O'BRIEN, 2008). A limpeza simples feita apenas com água pode espalhar o vírus através de calçados, roupas, gaiolas, utensílios e outros fômites. Assim, o primeiro passo para a descontaminação dos materiais que tiveram contato com fezes e secreções de aves é a remoção de matéria orgânica, realizada através da lavagem com detergentes e sabões. Em seguida, é recomendado o uso de desinfetantes para diminuir ou

eliminar a carga viral, e estes devem permanecer em contato com a superfície por um período mínimo de 10 minutos (PHILIPPA, 2008). O formaldeído e o peroximonossulfato de potássio são os desinfetantes mais recomendados para eliminação dos AIV (BIRNBAUM; O'BRIEN, 2008).

Diferentes tipos de vacinação contra os vírus da influenza podem ser utilizados em aves de produção, mas muitos países não as utilizam devido à interferência com as políticas de erradicação e acordos comerciais internacionais, como por exemplo o Brasil (BRASIL, 2006); no entanto, em situações de emergências a vacinação pode ser liberada. Outras medidas de controle e erradicação do vírus durante surtos em aves domésticas incluem o isolamento da área atingida por longo período, abate sanitário de todas as aves da granja e abate preventivo ou vacinação emergencial das aves nas granjas vizinhas. Para aves silvestres em cativeiro, medidas como higiene rigorosa do recinto e fômites, eutanásia seletiva, isolamento e tratamento com antivirais nos animais infectados, desinfecção da área e vacinação das aves revelaram-se eficazes na redução de surtos de influenza aviária (PHILIPPA, 2008).

Vale ressaltar que, para todas as espécies de aves, a OIE (sigla para *World Organisation for Animal Health*) considera a influenza aviária de alta patogenicidade uma doença de notificação obrigatória, devido ao seu alto potencial para propagação, impactos econômicos e riscos à Saúde Pública. Já a influenza aviária de baixa patogenicidade deve ser obrigatoriamente notificada apenas quando encontradas em aves domésticas (OIE, 2013).

2.1.9 Diagnóstico

A escolha do método diagnóstico depende de diversos fatores, como o objetivo do teste, custo, complexidade, sensibilidade e especificidade da técnica, disponibilidade de tempo e de mão-de-obra capacitada, materiais e reagentes necessários. Vale ressaltar que, para garantir o diagnóstico e o resultado adequados, técnicas apropriadas para colheita, armazenamento e processamento de amostras devem ser sempre efetuadas (SPACKMAN et al., 2008).

No caso dos AIV, os sinais clínicos, lesões ou a detecção de anticorpos levam apenas a um diagnóstico presuntivo; não há qualquer manifestação patognomônica conhecida para estes vírus. Assim, o diagnóstico definitivo deve ser estabelecido através do isolamento viral e

sua caracterização, ou então através da detecção de material genético viral pela reação em cadeia da polimerase (PCR) ou sequenciamento genético (PHILIPPA, 2008).

Os métodos diagnósticos diretos baseiam-se na detecção de partículas virais, proteínas ou ácidos nucleicos virais e, entre eles, pode-se citar: isolamento viral em ovos embrionados, testes de detecção de antígenos, teste de imunodifusão em ágar gel por detecção de antígeno e testes moleculares. Além disso, existem provas diagnósticas diretas que permitem a subtipificação das glicoproteínas HA e NA envolvidas e caracterização genética e patogênica da estirpe viral, sendo elas: reação de inibição de hemaglutinação (HI), reação de inibição da neuraminidase (NI), sequenciamento genético e patotipificação *in vivo*. Por fim, existem ainda as provas diagnósticas indiretas, isto é, aquelas que se baseiam na detecção da resposta imune do hospedeiro aos antígenos virais, como o teste de imunodifusão em gel de ágar por detecção de anticorpo e o ensaio imunoenzimático (ELISA) (SPACKMAN et al., 2008; BROOKS et al., 2012).

2.1.9.1 Testes diagnósticos diretos

O isolamento viral é um teste referência no diagnóstico dos AIV, pois possui alta sensibilidade, permite a detecção do vírus em qualquer estágio da infecção ativa e pode-se utilizar diversos tipos de amostras (*swabs* orais e cloacais, tecidos, amostras provenientes do ambiente). Apesar de o isolamento viral ser um teste laboratorial de grande importância para o estudo da influenza aviária, algumas limitações devem ser consideradas, como: custo, tempo para obtenção do resultado, necessidade de laboratório com alto nível de biossegurança, elevado grau de habilidade para realizar a técnica e interpretar os resultados, organização do cronograma com mão-de-obra disponível para recebimento, armazenamento e manutenção dos ovos embrionados. Além disso, o isolamento viral requer a presença de partículas virais viáveis (não-degradadas), e é necessário confirmar a presença viral através de testes complementares, pois é muito comum haver reação cruzada com outros patógenos aviários (*e.g.*, *paramyxovirus* tipo I) (SPACKMAN et al., 2008). A avaliação do sucesso do isolamento viral é feita pela reação de hemaglutinação a partir do líquido alantóico ou amniótico (TERREGINO; CAPUA, 2009).

Inúmeros testes comerciais para detecção dos vírus da influenza A existem no

mercado, mas a maioria deles está apenas disponível para uso humano. Nos Estados Unidos, dois testes têm sido amplamente utilizados: *FluDetect*TM (Synbiotics Inc., San Diego, Califórnia), preconizado para uso veterinário, e *Directigen*TM *Flu A test* (Becton-Dickenson, Franklin Lakes, NJ), preconizado para uso humano mas que tem sido usado em aves de produção apresentando bons resultados. Em ambos os testes, os kits utilizam anticorpo monoclonal direcionado contra uma região altamente conservada da nucleoproteína (NP) do vírus da influenza A. Esta reação ocorre em um filtro, e seu resultado pode ser visualizado através da presença de banda ou faixa devido à reação cromatográfica imunoquímica. A maior limitação deste teste é a baixa sensibilidade, não sendo recomendada sua utilização para monitoramento viral (apenas para *screening* de aves doentes ou como teste complementar). Por outro lado, suas grandes vantagens são a rapidez na obtenção do resultado (entre 15 e 20 minutos) e a alta especificidade; além disso, são testes fáceis de interpretar, não requerem mão-de-obra altamente especializada e são mais baratos quando comparados ao isolamento viral (SPACKMAN et al., 2008).

O teste de imunodifusão em gel de ágar por detecção de antígeno tem como base a visualização da reação de imunoprecipitação dos anticorpos de referência e os antígenos virais presentes na amostra após a difusão em meio ágar. Esta prova é de simples realização, e não necessita de materiais pouco usuais e nem equipamentos dispendiosos; é necessário, no entanto, treinamento moderado para interpretar os resultados (RÁCZ, 2008b; SPACKMAN et al., 2008).

As técnicas de biologia molecular para a detecção dos AIV são bastante úteis e eficazes para o monitoramento destes vírus graças à sua alta sensibilidade e especificidade, elevada repetibilidade, custo moderado, baixo risco de contaminação com material infectante (o vírus é inativado logo no início do processamento), possibilidade de uso na detecção de vírus vivos ou inativados e de testar inúmeros tipos de material biológico (STEININGER et al., 2002; KOENIG et al., 2003). A reação de transcriptase reversa seguida por PCR em tempo real (*Real Time* RT-PCR) transformou-se na técnica de biologia molecular padrão para a detecção e quantificação de RNA viral. Esta técnica oferece vantagens adicionais quando comparada à PCR tradicional: é o teste molecular mais rápido disponível (resultados em menos de 3 horas), possui maior especificidade e sensibilidade, e reduzida possibilidade de contaminação cruzada; é considerada ideal para o monitoramento de rotina dos AIV, assim como para o acompanhamento epidemiológico de surtos (SPACKMAN et al., 2008).

2.1.9.2 Provas de caracterização viral

Para a caracterização viral de uma amostra positiva para AIV, existe a necessidade de níveis muito altos de biossegurança e biosseguridade laboratorial, e/ou equipamentos e *kits* diagnósticos de alto-custo, além da mão-de-obra altamente especializada (SPACKMAN et al., 2008).

A reação de inibição da hemaglutinação é bastante utilizada com duas finalidades: como um método de exclusão de reação cruzada com *paramyxovirus* tipo 1 (vírus da doença de Newcastle) e para determinação do subtipo da glicoproteína HA envolvida na amostra positiva. A reação baseia-se na propriedade inerente dos *influenzavirus A* e *paramyxovirus* tipo 1 em causar a aglutinação de eritrócitos de galinha *in vitro*. Se uma amostra derivada de isolamento em ovos embrionados for exposta a anticorpos (anti-soros) específicos contra um certo subtipo de HA do vírus da influenza, esta reação de aglutinação poderá ser inibida de acordo com a estirpe viral presente, permitindo assim a sua caracterização. Para excluir a possibilidade de reação cruzada com os *paramyxovirus* tipo 1 que podem produzir um falso positivo no diagnóstico do vírus da influenza, é utilizado anticorpo específico contra o vírus da doença de Newcastle. O resultado negativo (ocorrência da hemaglutinação) indica que não houve reação antígeno (amostra) – anticorpo, ou seja, provavelmente o vírus da doença de Newcastle não está presente e a amostra é positiva para AIV. Para identificação do subtipo de hemaglutinina, é utilizado um painel de anti-soros específicos para cada um dos 16 subtipos de HA. Vale ressaltar que a especificidade deste teste é extremamente dependente da qualidade do painel de anti-soros. As principais vantagens deste teste é o baixo custo e a eliminação da necessidade de equipamentos e *kits* diagnósticos caros, bem como de mão-de-obra altamente especializada (WERNER; HARDER, 2006; SPACKMAN et al., 2008; TERREGINO; CAPUA, 2009).

A reação de inibição da neuraminidase é utilizada para determinar o subtipo de neuraminidase envolvido em amostras positivas para AIV. A reação baseia-se na atividade lítica da neuraminidase sobre o ácido N-acetil neuramínico, produzindo β -FPA (ácido β -formilpirúvico), que sob ação do arsenito de sódio produz uma reação colorimétrica de coloração rósea. Utilizando anticorpos (anti-soro) específicos para inibir os diferentes subtipos de neuraminidase, é possível determinar que o subtipo de neuraminidase da amostra será aquele para o qual o antisoro inibe a reação colorimétrica. Assim como para a reação de

inibição de hemaglutinação, a especificidade deste teste também é extremamente dependente da qualidade do painel de anti-soros (SPACKMAN et al., 2008; TERREGINO; CAPUA, 2009).

A obtenção da sequência genética dos AIV é importante por dois motivos: para permitir a caracterização como HPAI dos subtipos H5 e H7 encontrados (através da compatibilidade da sequência do sítio de clivagem de HA com outros HPAI) e a análise molecular epidemiológica (identificação da provável origem geográfica e animal ou humana do vírus através da comparação com achados anteriores). Apesar de menos comum, o sequenciamento genético também pode ser utilizado como método primário de determinação de HA e NA após o isolamento viral. A limitação desta técnica se dá pelo custo e pela necessidade de conhecimento e treinamento técnicos avançados, bem como o tempo para obtenção e análise do resultado (SPACKMAN et al., 2008).

A patotipificação *in vivo* é utilizada para classificar os subtipos H5 e H7 como HPAI ou LPNAI, baseada nas definições da OMS. Para serem classificados como HPAI, os vírus da influenza A devem levar a óbito, após 10 dias da inoculação intravenosa, 75% ou mais de oito galinhas com 4 a 8 semanas de vida. Nas mesmas condições, se o vírus apenas causar a morte de menos de seis galinhas (< 75%), o vírus é considerado LPNAI. Além disso, deve-se levar em conta o Índice de Patogenicidade Intravenosa (IVPI, sigla em inglês para *Intravenous Pathogenicity Index*), que é calculado da seguinte forma: i) o líquido alantóide infectado (obtido através do isolamento viral, com título de reação de hemaglutinação superior a 16) é diluído a 10% em solução salina isotônica, ii) 0.1 mL desta solução é inoculada por via intravenosa em 10 galinhas SPF de 4 a 8 semanas de vida, iii) as aves são examinadas a cada 24 horas por 10 dias, sendo classificadas segundo um escore de 0 a 3 (0 – normal, 1 – doente, 2 – severamente doente, 3 – óbito), e iv) o índice IVPI é calculado como a média dos escores diários de todas as aves ao longo dos 10 dias. O IVPI pode variar de 0 (todas as aves sem sinais clínicos por todo o período) a 3 (todas as aves vieram a óbito no primeiro dia); consideram-se HPAI as cepas que possuem um IVPI superior a 1.2. Apesar deste teste fornecer importantes informações acerca da patogenicidade viral, seu uso ainda é limitado pela necessidade de mão-de-obra altamente especializada e laboratório BSL3+ (*Biosafety Level 3+*) com biotério (WERNER; HARDER, 2006; SPACKMAN et al., 2008).

2.1.9.3 Testes diagnósticos indiretos

Os testes para detecção de anticorpos são comuns e relativamente baratos quando comparados aos métodos de detecção viral. É importante salientar, no entanto, que estes testes são indiretos, isto é, indicam a exposição ao vírus e não à infecção propriamente dita (RÁCZ, 2008b; SPACKMAN et al., 2008; TORTORA et al., 2012). Testes sorod diagnósticos têm sido bastante utilizado para monitoramento dos AIV tanto em aves doméstica quanto em aves silvestres (SPACKMAN et al., 2008).

O princípio do teste de imunodifusão em gel de ágar para detecção de anticorpo é semelhante à mesma prova quando utilizada para a detecção de antígenos, sendo que para a detecção de anticorpos utiliza-se um antígeno de referência para determinar a presença de anticorpos na amostra de soro. Possui sensibilidade moderada, mas pode detectar uma infecção mais precocemente que os outros testes, uma vez que há excelente detecção da IgM. Os anticorpos podem ser detectados de 5 dias após a infecção até semanas a meses, porém, vale ressaltar que a duração dos anticorpos varia de acordo com a estirpe e hospedeiros envolvidos. É importante considerar, ainda, que estudos têm demonstrado que o teste de imunodifusão em gel de ágar pode não produzir resultados consistentes a partir de soro de algumas espécies de aves, como patos; porém, o teste tem sido adequado à utilização em amostras proveniente de galinhas e perus (SPACKMAN et al., 2008).

Existem diversos tipos de *kits* comerciais de ensaios imunoenzimáticos (ELISA) disponíveis para detecção de anticorpos anti-AIV, e esta detecção pode ser feita em soro, plasma e gema de ovo. Em comparação aos testes de imunodifusão, o ELISA é mais rápido, permite um volume maior de amostras a serem analisadas e a interpretação do resultado é menos subjetiva; no entanto, apesar de ter uma sensibilidade muito maior, o número de falsos-positivos é alto, resultando em baixa especificidade (WERNER; HARDER, 2006; SPACKMAN et al., 2008; BROOKS et al., 2012; TORTORA et al., 2012).

2.2 AVES MIGRATÓRIAS

Por definição, são consideradas aves migratórias “o conjunto ou partes geograficamente isoladas da população de uma mesma espécie ou grupo taxonômico, do(s) qual(is) uma parcela significativa atravessa uma ou mais fronteiras da jurisdição nacional” (GROMS, 2013).

2.2.1 Rotas migratórias

Uma rota migratória pode ser definida como “a completa extensão na qual uma espécie migratória (ou grupos, ou espécies relacionadas, ou populações distintas de uma mesma espécie) se locomove anualmente de uma área de reprodução para uma área de não-reprodução, incluindo lugares intermediários de descanso e alimentação, bem como áreas de ocorrência das mesmas” (BOERE; STROUD, 2006).

Anualmente, com a aproximação do outono, milhões de aves deixam suas áreas de reprodução em busca de locais com temperaturas mais amenas e com maior disponibilidade de alimento, para posteriormente retornarem às suas áreas de origem durante a primavera e verão, completando assim seu ciclo biológico (Figura 3) (SICK, 1983; NUNES et al., 2006).

A migração e o ciclo de vida de aves aquáticas, em especial as costeiras e pelágicas, é um dos mais extraordinários fenômenos do planeta; são complexos e variáveis em decorrência da diversidade de estratégias utilizadas pelas diferentes espécies migratórias (AZEVEDO-JÚNIOR et al., 2001, 2002). A impressionante capacidade de voo de muitas espécies permite que esses animais possam ocupar uma grande variedade de ambientes ao longo de sua ampla distribuição geográfica (FURNESS et al., 1994; BERTHOLD, 1999; NEWTON, 2008).

O sucesso migratório está relacionado à superação de múltiplos desafios, que variam desde mudanças morfofisiológicas do próprio indivíduo, como acúmulo de gordura e muda de penas (AZEVEDO-JÚNIOR et al., 2001, 2002; LEU; THOMPSON, 2002), ao enfrentamento de árduas condições ambientais, como tempestades, furacões e outras intempéries (MYERS et al., 1987; RAPPOLE, 1993).

Figura 3 - Principais rotas migratórias (*flyways*) de aves que se deslocam entre os Hemisférios Norte e Sul

Fonte: Boere e Stroud (2006), adaptação de Hurtado (2013)

Os ambientes escolhidos pelas aves migratórias ao longo de suas rotas são diversos e estão relacionados aos seus hábitos alimentares, estratégias de forrageamento e disponibilidade de recursos. Devido à distribuição descontínua destes recursos, as espécies migrantes geralmente se concentram em áreas específicas. Estes locais têm importância fundamental para conservação dessas espécies, uma vez que elas necessitam de áreas-chave ao longo de suas migrações para trocarem as penas, se alimentarem e adquirirem as reservas energéticas necessárias para a continuação de suas longas viagens (SICK, 2001).

As aves migratórias não reconhecem fronteiras geopolíticas; além disso, a capacidade de se deslocarem por grandes distâncias e o tamanho significativo destas populações, podem fazer com que estas aves sejam consideradas uma das mais importantes vias de introdução e disseminação da influenza aviária ao Brasil (FOUCHIER et al., 2007). Ainda são insuficientes os dados para uma análise de risco quanto à possível chegada deste vírus ao Brasil por intermédio das rotas migratórias da avifauna. De maneira geral, é muito restrito o conhecimento sobre biologia e ecologia migratória de aves pelo interior do país, sendo a maior parte de informações disponíveis limitada a alguns Charadriiformes ao longo da região costeira. Pouco se sabe acerca da suscetibilidade ao AIV de cada uma das espécies migrantes para permitir uma avaliação de seu potencial como reservatórios, carreadores e transmissores do vírus. Para tal, é urgente o desenvolvimento de estudos dos padrões migratórios das

espécies, ecologia, comportamento e epidemiologia das diferentes estirpes virais em diferentes grupos de aves silvestres (NUNES et al., 2006).

No Brasil, a porção norte é considerada porta-de-entrada dos migrantes setentrionais no país; a Amazônia e a zona costeira das regiões Norte e Nordeste são locais com muitos registros de espécies migratórias do Hemisfério Norte. Estas aves chegam ao país entre setembro e outubro e regressam às suas áreas de reprodução entre março e maio. Projeções de cenários para uma possível chegada do vírus ao Brasil indicam que as rotas migratórias de maiores riscos seriam aquelas oriundas da América do Norte (Estados Unidos e Canadá), justamente por serem as mais frequentemente utilizadas pelas aves para entrar ao país (Figura 4). Cerca de 60% das espécies migratórias brasileiras utilizam estas rotas de migração anualmente. Além disso, existem deslocamentos de aves entre a América do Norte e oeste Europeu, dois continentes com numerosos registros de ocorrência do vírus da influenza (SICK, 2001; NUNES et al., 2006).

Assim, os locais de concentração de aves migratórias, além de sua relevância para a conservação da avifauna, tornam-se importantes no contexto de vigilância epidemiológica dos países, pois sabe-se que nestas áreas há grande potencial para a transmissão de patógenos (NUNES et al., 2006).

Figura 4 - Principais rotas migratórias que interligam as Américas do Norte, Central e do Sul

Fonte: Nunes et al. (2006), adaptação de Hurtado (2013)

2.2.2 Espécies

Das 152 espécies de aves migratórias registradas regularmente ou esporadicamente no Brasil, 91 são visitantes setentrionais (possuem seus sítios de reprodução no Hemisfério Norte) e 61 são meridionais (reproduzem-se em áreas do Hemisfério Sul e da Antártida). Dentre o total de migrantes, grande parte é compreendida pelas aves limícolas (HARRINGTON et al., 1986; SICK, 2001; NUNES et al., 2006).

As aves limícolas são definidas como espécies aquáticas características das zonas entremarés, marginais a corpos d'água ou áreas alagadas, cuja profundidade não ultrapassa o comprimento dos membros inferiores (NASCIMENTO; LARRAZÁBAL, 2000). Dentre estas espécies, destacam-se os maçaricos e batuíras (famílias Scolopacidae e Charadriidae), os quais abrangem 152 das 217 espécies reconhecidas para a ordem Charadriiformes (WARNOCK et al., 2001; PIERSMA, 2007). São aves em constante movimentação e, por se deslocarem sazonalmente entre hemisférios, as aves limícolas migratórias aproveitam as melhores condições ambientais de cada área (PIERSMA, 2007). Os principais sítios reprodutivos das espécies ocorrentes nas Américas estão inseridos nas altas latitudes da região Neártica (Estados Unidos e Canadá), onde os dias longos do verão boreal permitem que os indivíduos mantenham um ritmo de forrageamento acelerado para acumular reservas energéticas e prepararem-se para a migração (MEYERS et al., 1990; LEU; THOMPSON, 2002). Em meados de setembro, com o início do outono setentrional, milhares de indivíduos iniciam seu deslocamento para as regiões mais quentes ao longo das Américas Central e do Sul, onde permanecerão até meados de março a abril (SICK, 2001; NEWTON, 2008).

A migração anual dessas espécies envolve, conseqüentemente, uma interligação de diversos ecossistemas. O litoral Atlântico constitui uma das principais rotas migratórias transequatorial de aves limícolas neárticas (ANTAS, 1983, 1986). Vinte e cinco das 57 espécies de aves limícolas que se reproduzem nos Estados Unidos e Canadá chegam ao território brasileiro (VOOREN; BRUSQUE, 1999; SICK, 2001).

Para se alcançar os locais de invernada, as aves percorrem rotas que podem ser ininterruptas ou com sítios de parada para descanso e forrageio (MEYERS et al., 1990). O alimento obtido nas áreas de descanso fornece energia essencial para a continuidade do deslocamento em vôo e para o sucesso reprodutivo quando essas aves retornam às áreas de procriação (AZEVEDO-JÚNIOR et al., 2001, 2002; RODRIGUES et al., 2009). Durante o

período não-reprodutivo, as aves limícolas apresentam um comportamento gregário, as quais formam grandes concentrações de indivíduos que forrageiam em zonas entremarés de praias, estuários e lagoas (WARNOCK et al., 2001).

Por outro lado, outro grupo que possui um papel crítico na epidemiologia da influenza aviária, ainda que tipicamente não realize grandes migrações entre as Américas do Norte e do Sul, é formado pelas aves da ordem Anseriformes. O Brasil não é um país rico em espécies pertencentes a esta ordem; a família Anatidae, representada por patos, marrecos e gansos, possui 25 espécies, das quais 21 ocorrem no Rio Grande do Sul (SICK, 2001). A grande maioria das espécies migra entre países da América do Sul, com a única exceção da marreca-de-asa-azul *Anas discors*, que se reproduz nos Estados Unidos e Canadá e migra no outono para as regiões setentrionais da América do Sul (incluindo o Brasil), chegando até a Argentina e Uruguai (NUNES et al., 2006). Em estudo sobre recuperações de anilhas estrangeiras no Brasil de 1927 a 1980 (LARA-RESENDE, 1983), *Anas discors* apareceu como a segunda espécie de ave mais recuperada no país, sendo os registros concentrados principalmente em uma faixa costeira do litoral Norte, mas ocorrendo também no Sul e Sudeste. À parte deste estudo, no entanto, ainda são escassas as informações sobre ecologia, distribuição, *status* de conservação e padrões migratórios dessa espécie (NUNES et al., 2006).

As grandes concentrações de Anatidae ocorrem no Rio Grande do Sul, Pantanal mato-grossense, Amapá e região Nordeste. Na Amazônia, as frequentes e duradouras enchentes dos rios, principalmente do rio Amazonas, expulsam essas aves dependentes de águas claras ou rasas, provocando seus deslocamento a outras regiões. No Rio Grande do Sul, já foram encontrados inúmeros exemplares de marrecão *Netta peposaca*, marreca-parda *Anas georgica*, marreca-cricri *Anas versicolor* e marreca-de-cabeça-preta *Heteronetta atricapilla* anilhados na Argentina. Desta maneira, descobriu-se que o curso migratório destes marrecos descreve um círculo que atinge o Brasil meridional no inverno (SICK, 2001).

2.3 INFLUENZA EM ANSERIFORMES E CHARADRIIFORMES

Não são comuns os registros de vírus da influenza aviária altamente patogênicos (HPAI) em aves silvestres. O primeiro relato de HPAI nestas aves ocorreu em 1961 na África do Sul, no qual a estirpe H5N3 causou mortalidade em massa de aproximadamente 1.300

trinta-réis-boreais *Sterna hirundo* (BEKER, 1966). Em 2002, um surto de influenza aviária causado pela HPAI H5N1 em aves domésticas e silvestres em Hong Kong, na China, levou a óbito diferentes espécies das ordens Anseriformes, Charadriiformes, Ciconiiformes e Phoenicopteriformes (ELLIS et al., 2004; HANSON et al., 2008). Ainda na China, um surto de HPAI H5N1 em 2005 causou alta mortalidade em aves migratórias, levando a um declínio de 10% na população global do ganso-de-cabeça-listrada *Anser indicus* (LIU et al., 2005; FOUCHIER et al., 2007).

Com exceção a estes exemplos, a grande maioria dos registros dos vírus da influenza A em aves silvestres corresponde às estirpes de baixa patogenicidade (LPAI). Os primeiros LPAI isolados em aves silvestres ocorreram em 1972, em amostras provenientes de patos na Califórnia, nos Estados Unidos, e de uma pardela-do-Pacífico *Puffinus pacificus chlororhynchus* em Queensland, na Austrália (DOWNIE; LAVER, 1973; SLEMONS et al., 1991).

Os primeiros isolamentos de HPAI e LPAI em aves silvestres cristalizaram as evidências iniciais de que as aves silvestres podem se infectar e transmitir os vírus da influenza A; a partir daí, iniciou-se um significativo esforço de monitoramento destes patógenos nos anos subsequentes (STALLKNECHT; BROWN, 2008; SWAYNE, 2008a). Como resultado, os vírus da influenza têm sido observados em mais 100 espécies, de 12 ordens distintas (STALLKNECHT; BROWN, 2008; HOYE et al., 2010). Inúmeros estudos demonstraram que a grande maioria das espécies acometidas estão associadas ao habitat aquático, em especial à ordem Anseriformes, seguida pela ordem Charadriiformes (Figuras 5 e 6) (SALOMON; WEBSTER, 2009). Estas aves são consideradas reservatórios tanto pela ausência de sinais clínicos (dependendo da estirpe viral e espécie envolvidas) quanto pela capacidade em abrigar todos os subtipos de HA e NA, exceto àqueles exclusivamente encontrados em morcegos (STALLKNECHT; SHANE, 1988; WEBSTER et al., 1992; FOUCHIER et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; SALOMON; WEBSTER, 2009; FEREIDOUNI et al., 2010; HANSBRO et al., 2010; DAOUST et al., 2011; GAIDET et al., 2012; LI et al., 2012; BROWN et al., 2013; SUN et al., 2013).

Dada à grande quantidade de estudos epidemiológicos realizados nas últimas décadas acerca da ocorrência do *influenzavirus A* em Anseriformes e Charadriiformes, sobretudo no Hemisfério Norte, será aqui adotada uma estratégia de priorizar a literatura que possa ter implicações mais diretas para o estudo dos AIV nas Américas.

Figura 5 - Exemplos de aves pertencentes à ordem Anseriformes: (a) pato-real *Anas platyrhynchos*, (b) marreca-de-asa-azul *Anas discors*, (c) marreca-cabocla *Dendrocygna autumnalis*, (d) marreca-irerê *Dendrocygna viduata*

Fotos: (a) Alain Carpentier, (b) John C. Avise, (c) wildfowl-photography.co.uk, (d) Alberto Alves.

Figura 6 - Exemplos de aves pertencentes à ordem Charadriiformes: (a) maçarico-pintado *Actitis macularius*, (b) maçariquinho *Calidris pusilla*, (c) vira-pedras *Arenaria interpres*, (d) batuíra-de-bando *Charadrius semipalmatus*

Fotos: (a) Richard Dreschler, (b) Guy Poisson, (c) Jari Peitomäki, (d) Cleber C. Ferreira.

2.3.1 Anseriformes

Para os Anseriformes, a maioria dos vírus da influenza A são relatados em aves da família Anatidae, subfamília Anatinae (patos não-mergulhadores) (FOUCHIER et al., 2007; WALLESTEN et al., 2007). A baixa ou ausente patogenicidade de inúmeras estirpes de AIV em patos silvestres pode ser resultado da adaptação viral a este hospedeiro ao longo dos séculos, criando um reservatório para assegurar a perpetuação viral. Assim, sugere-se que estas aves desempenhem um papel único e extremamente importante na história natural dos vírus da influenza A (WEBSTER et al., 1992). Dentre estas, a espécie pato-real *Anas platyrhynchos* (Anseriformes: Anatidae) é considerada um reservatório particularmente importante, dado o significativo número de isolamentos virais já realizados (FOUCHIER et al.,

2007; ARSNOE et al., 2011; DAOUST et al., 2011).

Diversos estudos conduzidos na Europa demonstraram que a maior prevalência se dá na espécie *Anas platyrhynchos* (WALLESTEIN et al., 2007, DUSEK et al., 2009; BREED et al., 2010). Outras espécies de Anseriformes também apresentaram prevalência relevante, como: ganso-grande-de-testa-branca *Anser albifrons*, pato-trombeteiro *Anas clypeata*, piadeira-americana *Anas americana*, marreca-arrebia *Anas acuta*, marrequinha-comum *Anas crecca*, marreco-comum *Anas querquedula*, olho-dourado *Bucephala clangula* e cisne-branco *Cygnus olor* (DUSEK et al., 2009; BREED et al., 2010; SAMBIEDA et al., 2010). À semelhança do observado em outros países, a prevalência de AIV na Europa tem sido sistematicamente mais elevada em juvenis do que em adultos (WALLESTEIN et al., 2007; LEWIS et al., 2013). Diferentes subtipos têm sido encontrados e, apesar da maioria ser classificada como LPAI ou LPNAI, Breed et al. (2010) detectaram 36 amostras positivas para HPAI H5N1 provenientes de Anseriformes silvestres encontrados mortos ou que manifestavam sinais clínicos.

A vigilância epidemiológica dos vírus da influenza tem revelado a presença de estirpes HPAI em diferentes países da Ásia. Deve-se ter em mente, no entanto, que apesar de a China ser conhecida por surtos de vírus da influenza de alta patogenicidade, a taxa de isolamento viral em aves silvestres tem sido bastante baixa. Por exemplo, um estudo conduzido por Chen et al. (2006b), apenas 44 das 13.115 (0.33%) amostras colhidas de patos e gansos migratórios em sete diferentes províncias chinesas foram positivas ao isolamento viral; destas, as únicas seis que revelaram-se HPAI foram encontradas em aves aparentemente saudáveis. No entanto, à exceção deste estudo, também tem sido relatado que a grande maioria dos HPAI encontrados em Anseriformes silvestres na Ásia estão ligados às amostras provenientes de carcaças (GILBERT et al., 2012; KIM et al., 2012; CHEN et al., 2006a,b) e que os Anseriformes também podem ser suscetíveis aos efeitos devastadores das estirpes de alta patogenicidade (LIU et al., 2005; FOUCHIER et al., 2007). As espécies pato-mandarim *Aix galericulata*, marreca-formosa *Anas formosa*, *Anas platyrhynchos*, pato-de-bico-pintado *Anas poecilorhyncha*, *Anser albifrons* e cisne-bravo *Cygnus cygnus* também já foram positivas para os vírus da influenza A (CHEN et al., 2006a,b; GILBERT et al., 2012; KIM et al., 2012). Quanto aos LPAI, os subtipos mais encontrados incluem: H1, H3, H6, H4, H5, H6, H10, H11, N1, N2 e N8 (CHEN et al., 2006b; ABAO et al., 2013).

O continente africano, em especial a região subsaariana, constitui um abrigo sazonal para um grande número de aves da Eurásia. Estima-se que 5.4 milhões de patos viajam ao

leste e oeste da África durante o inverno no Hemisfério Norte. Em um estudo conduzido neste continente, o vírus da influenza A foi encontrado em oito países (Chade, Etiópia, Mali, Mauritânia, Níger, Senegal, Marrocos e Tunísia), revelando que as espécies *Anas querquedula* e marreca-irerê *Dendrocygna viduata* apresentaram alta prevalência, sendo os subtipos H1N1, H5N3, H8N4, H11N9 e H12N5 os mais frequentes (GAIDET et al., 2007). Já um estudo de longo-prazo realizado no Egito entre 2003 e 2009 encontrou as espécies marreca-de-asa-verde *Anas carolinenses*, *Anas clypeata* e *Anas acuta* com elevada prevalência do vírus da influenza aviária (SOLIMAN et al., 2012).

À semelhança dos demais continentes, estirpes virais de alta e baixa patogenicidade têm sido encontrados em aves na Oceania. Na Austrália, cinco surtos de HPAI já ocorreram, todos causados pelo subtipo H7. Estudos demonstraram uma prevalência maior do vírus em aves jovens e no início da primavera; os subtipos mais isolados foram de H1 a H12 e todos os NA, exceto N2, N4 e N8 (HANSBRO et al., 2010). Na Nova Zelândia, um estudo isolou as estirpes LPNAI H5N2 e H4N6 em *Anas platyrhynchos* (STANISLAWEK et al., 2002).

A América do Norte é o continente no qual mais se tem monitorado os vírus da influenza em aves silvestres (WALLESTEN et al., 2007). Diversos estudos demonstraram que a maior prevalência se dá nas espécies pertencentes ao gênero *Anas*; dentre quais se destacam *Anas discors* e *Anas platyrhynchos* (STALLKNECHT et al., 1990b; ALFONSO et al., 1995; HANSON et al., 2008; DUSEK et al., 2009; PARMLEY et al., 2009; GOEKJIAN et al., 2011). Outras espécies de Anseriformes que também apresentaram prevalência relevante em outros estudos incluem: *Anser albifrons*, *Anas clypeata* e *Anas americana* (DUSEK et al., 2009; SAMBIEDA et al., 2010). Os subtipos de HA mais frequentemente isolados em Anseriformes na América do Norte são H3, H4 e H6 (STALLKNECHT et al., 1990b; KRAUSS et al., 2004; OLSEN et al., 2006; WEBSTER et al., 2007; HANSON et al., 2008; SAMBIEDA et al., 2010), apesar de alguns estudos encontrarem alta prevalência de H10 (KRAUSS et al., 2004; SAMBIEDA et al., 2010). Por outro lado, todos os nove subtipos da glicoproteína NA costumam ser encontrados com prevalência bastante variada entre os estudos, sendo difícil definir os mais predominantes (STALLKNECHT et al., 1990b; KRAUSS et al., 2004; OLSEN et al., 2006; WEBSTER et al., 2007; HANSON et al., 2008; SAMBIEDA et al., 2010). Em relação à faixa etária, indivíduos jovens tendem a apresentar uma prevalência de LPAI mais elevada do que os adultos (STALLKNECHT et al., 1990b; ALFONSO et al., 1995; HANSON et al., 2003; OLSEN et al., 2006; SAMBIEDA et al., 2010). Quanto à sazonalidade, a prevalência dos vírus da influenza tende a ser mais alta

durante a primavera e outono (STALLKNECHT et al., 1990b; ALFONSO et al., 1995; OLSEN et al., 2006; HANSON et al., 2008; SAMBIEDA et al., 2010; GOEKJIAN et al., 2011).

Em contraste à América do Norte, o monitoramento do vírus em aves silvestres nas Américas Central e do Sul tem sido mínimo (SPACKMAN et al., 2006, 2007). Por esta razão, sabe-se muito pouco sobre a prevalência dos AIV e a conectividade epidemiológica das estirpes virais entre Anatidae dos Hemisférios Sul e Norte (OLSEN et al., 2006). Na América Central, um estudo realizado entre 2007 e 2010 na Guatemala detectou 28 aves positivas, todas *Anas discors*; os subtipos isolados foram H3N8, H5N3, H5N4 H7N9, H8N4 e H11N2; embora tenham sido registradas cepas dos subtipos H5 e H7, todas foram classificadas como LPNAI (GONZÁLEZ-REICHE et al., 2012).

A maioria dos Anseriformes da América do Sul permanece no continente durante o ano todo, e a espécie *Anas discors* é a única representante desta ordem que migra entre a América do Norte e Brasil (NUNES et al., 2006). Embora muitos outros patos não-migrantes (ou que migram apenas regionalmente) possam servir como hospedeiros dos AIV, não existem dados suficientes de monitoramento disponíveis (OLSEN et al., 2006); até o momento, são poucos os trabalhos relatando a presença do vírus em Anseriformes no continente (SPACKMAN et al., 2006; PEREDA et al., 2008).

O primeiro isolamento de um AIV na América do Sul foi em uma marreca-carijó *Anas cyanoptera* amostrada em 2001 na Bolívia; apesar de a estirpe H7N3 estar envolvida, a caracterização molecular do sítio de clivagem de HA revelou tratar-se de uma cepa LPNAI (SPACKMAN et al., 2006). Na Argentina, o vírus da influenza A já foi detectado nas seguintes espécies: *Netta peposaca*, *Anas versicolor*, marreca-colhereira *Anas platalea*, marreca-ananaí *Amazonetta brasiliensis* e *Anas cyanoptera*, e os seguintes subtipos foram encontrados: H5N3, H6N2, H6N8, H7N9, H9N2 (RIMONDI et al., 2011). Ainda na Argentina, Pereda et al. (2008) detectaram o vírus da influenza por métodos moleculares em 12 Anseriformes silvestres, mas não foi obtido sucesso ao isolamento viral. Entre 2006 e 2007 no Peru, foram isoladas as estirpes H3N8 e H4N5 a partir de amostras fecais de marreca-toicinho *Anas bahamensis* e também de *Anas cyanoptera* (GHERSI et al., 2009).

2.3.2 Charadriiformes

Juntamente com os Anseriformes, as aves pertencentes à ordem Charadriiformes, particularmente das famílias Charadriidae e Scolopacidae, são consideradas os principais reservatórios dos vírus da influenza A (WEBSTER et al., 2007). Dentre estas, o vira-pedras *Arenaria interpres* (Charadriiformes: Scolopacidae) é a espécie com maior frequência de isolamento dos AIV (KAWAOKA et al., 1988; HANSON, 2008; STALLKNECHT; BROWN, 2008; STALLKNECHT et al., 2012); conhecida por realizar espetaculares migrações de longa distância, chegam a percorrer 7.600 Km em voo ininterrupto (RODRIGUES et al., 2009; MINTON et al., 2011).

Estudos de longo-prazo conduzidos na Europa demonstraram que as aves mais frequentemente envolvidas na circulação dos AIV no continente são as gaivotas pertencentes aos gêneros *Larus* e *Chroicocephalus*, bem como as espécies maçarico-de-perna-vermelha *Tringa totanus*, *Arenaria interpres*, maçarico-de-papo-vermelho *Calidris canutus* e trinta-réis-do-Ártico *Sterna paradisaea*. Com relação aos subtipos, as hemaglutininas mais prevalentes têm sido H3, H4, H7, H11, H9, H13 (SÜSS et al., 1994; BREED et al., 2010; BORM et al., 2012; LEWIS et al., 2013). O pico de detecção dos AIV ocorre geralmente durante o outono (BREED et al., 2010; LEWIS et al., 2013).

Na Ásia, dois importantes surtos de HPAI H5N1 envolvendo alta mortalidade de aves silvestres aconteceram em 2005. O primeiro deles ocorreu na China, onde esta estirpe foi isolada em carcaças de duas espécies de gaivotas: gaivotão-de-cabeça-preta *Larus ichthyaetus* e gaivota-do-Índico *Chroicocephalus brunnicephalus* (LIU et al., 2005). Três meses depois, na Mongólia, também foi encontrado HPAI H5N1 em gaivotas-prateadas *Larus argentatus*. Apesar de um sistema de monitoramento em aves silvestres ter sido implementado na Mongólia no mesmo ano, poucos estudos foram conduzidos acerca do papel dos Charadriiformes na epidemiologia dos vírus da influenza de alta patogenicidade (GILBERT et al., 2012). Em relação aos LPAI neste país, as estirpes H13N6 e H16N6 já foram isoladas em gaivotas das espécies gaivota-de-cabeça-preta *Chroicocephalus ridibundus* e gaivota-da-Mongólia *Larus vagae mongolicus*, respectivamente (SPACKMAN et al., 2009). No Vietnã, a estirpe LPNAI H5N2 foi isolada a partir de uma espécie migratória de galinhola *Scolopax rusticola* (TAKAKUWA et al., 2013).

Por abrigar milhares de aves migratórias, diversos locais na África podem ser

considerados *hotspots* para os Charadriiformes, tornando essencial a vigilância epidemiológica neste continente. Assim, dois grandes estudos foram realizados em cerca de 25 países no Velho Mundo, e o resultado encontrado em ambos demonstrou uma prevalência relativamente baixa dos AIV nas localidades estudadas (~3%). Dentre as aves positivas, pode-se citar *Arenaria interpres*, maçarico-branco *Calidris alba*, maçarico-alpino *Calidris alpina*, *Calidris canutus*, gaivota-de-asa-escura *Larus fuscus*, gaivota-do-Mediterrâneo *Larus melanocephalus* e gaivota-de-bico-fino *Chroicocephalus genei*, além de diferentes espécies de trinta-réis *Sterna* sp. (GAIDET et al., 2007, 2012).

Na Oceania, cerca de 3 milhões de maçaricos migram para a Austrália e Nova Zelândia anualmente. Até a chegada ao país, inúmeras espécies partem da Sibéria e utilizam o continente asiático como “ponto de parada” - muitas vezes em locais conhecidos pela ocorrência de surtos de HPAI H5N1. Apesar disso, esta estirpe nunca foi detectada nestes dois países, e a prevalência de AIV em Charadriiformes tem sido relativamente baixa (0.5% a 5.7%). As espécies fuselo *Limosa lapponica*, maçarico-de-pescoço-vermelho *Calidris ruficollis*, maçarico-siberiano *Numenius madagascariensis*, maçarico-de-cauda-afiada *Calidris acuminata* e *Calidris canutus* já foram positivas para os vírus da influenza A (HURT et al., 2006; HANSBRO et al., 2010). Os subtipos H3, H4, H9, H11, N8 e N9 foram os mais prevalentes (HURT et al., 2006; HANSBRO et al., 2010). Ainda, em 2006, a estirpe H13N6 foi isolada em uma gaivota-prata *Chroicocephalus novaehollandiae* na Tasmânia, Austrália (SENNE, 2010). Em relação a estação do ano, a prevalência revelou-se maior durante o outono e início do inverno (HANSBRO et al., 2010).

Na América do Norte, a Baía de Delaware (Delaware Bay, New Jersey, EUA), destaca-se como o local onde mais tem sido estudado e isolado os vírus da influenza A em Charadriiformes no mundo (HANSON et al., 2008; KRAUSS et al., 2010; GAIDET et al., 2012; BROWN et al., 2013). Por conta disto, parte do conhecimento sobre AIV na América do Norte é enviesado aos resultados obtidos em Delaware Bay. Estes estudos têm revelado prevalência bastante variada dos subtipos de HA e NA, não sendo fácil, portanto, determinar os mais prevalentes. Alguns estudos relatam que H3 e H11 são os mais frequentes; outros, demonstram uma maior prevalência de H1, H7, H9, H10, H12 e H13 (KAWAOKA et al., 1988; KRAUSS et al., 2004, 2007; OLSEN, 2006; FOUCHIER et al., 2007; HANSON et al., 2008; STALLKNECHT; BROWN, 2008; STALLKNECHT et al., 2012). Esta variação parece estar relacionada à espécie envolvida, localização, tipo de amostra colhida e sazonalidade (KRAUSS et al., 2004; STALLKNECHT; BROWN, 2008; HOYE et al., 2010;

STALLKNECHT et al., 2012); por exemplo, foi observado que o subtipo H13 está principalmente associado à gaivotas (KAWAOKA et al., 1988; STALLKNECHT; BROWN, 2008). Além disso, a diversidade de subtipos não tem sido constante entre os anos (STALLKNECHT; BROWN, 2008). Para a glicoproteína NA, todos os subtipos aviários têm apresentado prevalência bastante variada; no entanto, em muitos casos os subtipos N7 e N9 podem ser identificados como predominantes, correspondendo a até metade das estirpes isoladas (KRAUSS et al., 2007). Os estudos nesta região constataam, ainda, que o vírus é detectado com maior frequência durante o mês de maio, embora sua distribuição em aves de diferentes grupos etários não esteja bem definida (HANSON et al., 2008; KRAUSS et al., 2010).

Pouco monitoramento do vírus da influenza A tem sido realizado nas Américas Central e do Sul e, até o momento, pouco se sabe sobre a ecologia e relações filogenéticas dos AIV em aves silvestres no Hemisfério Sul (SPACKMAN et al., 2006, 2007; PEREDA et al., 2008). Ainda que existam relatos destes vírus em aves domésticas na América Central, até o momento não há dados publicados sobre a circulação destes vírus em Charadriiformes no continente (SENNE, 2007, 2010). Na América do Sul, Pereda et al. (2008) registraram a presença do subtipo H13N9 em um gaivotão *Larus dominicanus* na província de Buenos Aires, Argentina. No Peru, a presença de AIV foi encontrada nas seguintes espécies: *Arenaria interpres* (H10N9), piru-piru *Haematopus palliatus* (H10N9), maçarico-galego *Numenius phaeopus* (H13N2) e *Larus dominicanus* (H13N2) (GHERSI et al., 2009). No Chile, já foram isolados AIV em duas espécies de gaivotas: gaivota-de-Franklin *Larus pipixcan* (H13N6) e *Larus dominicanus* (LPNAI H5N9) (SENNE, 2010). O Brasil, apesar de abrigar quatro dos sete principais pontos de internada das aves migratórias na América do Sul (NUNES et al., 2006), também possui pouquíssimos estudos acerca da ocorrência de AIV em Charadriiformes (SENNE, 2010). Durante um monitoramento realizado em 2003 pelo Ministério da Saúde no estado do Rio Grande do Norte, o subtipo H3 foi isolado em amostras provenientes de diferentes espécie de maçaricos (SVS, 2004).

2.4 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E SAÚDE PÚBLICA

A avicultura brasileira é atualmente uma atividade em franca expansão, cuja produção de carne de frango atinge cerca de 13 bilhões de toneladas/ano, correspondendo a quase 1.5% do Produto Interno Bruto (PIB) (R\$ 26 bilhões anuais). Sua importância não se resume apenas à sua contribuição para a economia do país, mas também por representar uma fonte de proteína de qualidade e economicamente acessível à população, uma vez que 69% da produção nacional é destinada ao consumo interno (VENTURINI et al., 2007; ABEF, 2013). Além disso, o Brasil é considerado o maior exportador e o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo (ABEF, 2013).

Neste contexto, as enfermidades infecciosas como a influenza aviária podem constituir importante risco para a economia e segurança alimentar do país. Desde a detecção do HPAI H5N1 em 1997 na China, o vírus se espalhou por três continentes e, até março de 2004, pelo menos 45 milhões de aves domésticas foram abatidas. Os custos da resposta internacional para contenção e eliminação da doença nos plantéis foram estimados em, no mínimo, US\$ 2 bilhões (FAO, 2007; JERNIGAN; COX, 2013). De um modo geral, somente entre os anos de 1999 e 2004, a infecção por AIV resultou em óbito ou abate sanitário de 200 milhões de aves domésticas, aproximadamente (FAO, 2007).

Assim, a possibilidade de o Brasil também registrar surtos da influenza aviária em seu território tem preocupado as autoridades nacionais e agentes do setor privado. Além das perdas com a mortalidade das aves na região do foco e os gastos públicos e/ou privados para o controle, limpeza e fiscalização, a experiência internacional tem demonstrado que a presença de vírus de alta patogenicidade em um país provoca acentuada queda no consumo interno e nas exportações de produtos avícolas (FACHINELLO; FILHO, 2008).

Além do setor econômico, outro fator preocupante é o potencial impacto à saúde pública. Em humanos, a influenza é uma doença respiratória altamente contagiosa que, embora muitas vezes auto-limitante, pode levar à substancial mortalidade. Apesar da dificuldade em determinar o impacto populacional, a OMS estima que cerca de um bilhão de infecções causadas pelo vírus da influenza ocorrem anualmente no mundo. Apenas nos Estados Unidos, o número de hospitalizações atinge a marca de 200.000 casos/ano, nos quais 36.000 acarretam em óbito do paciente devido às complicações causadas pelos vírus. Além disso, os custos relacionados diretamente ao tratamento médico dos pacientes chegam a US\$

10.4 bilhões anualmente (JERNIGAN; COX, 2013). No Brasil, os números referentes à hospitalização e mortalidade causadas por vírus da influenza são menos conhecidos, uma vez que a confirmação dos casos só é feita através de testes laboratoriais específicos e estes são frequentemente negligenciados tanto pelos médicos quanto pela falta de infraestrutura hospitalar (FREITAS et al., 2013). No entanto, em 2009 foi possível realizar uma efetiva vigilância epidemiológica na população brasileira quando o subtipo H1N1 emergiu; entre 19 de abril a 21 de novembro, foram 27.850 casos confirmados pelos Institutos Evandro Chagas (estado do Pará), Adolfo Lutz (estado de São Paulo) e Oswaldo Cruz (estado do Rio de Janeiro), dos quais 1.632 evoluíram para óbito (SVS, 2009). Mundialmente, estima-se que a influenza seja a causa de morte de 300.000 a 500.000 pessoas todos os anos (KATZ, 2009; JERNIGAN; COX, 2013).

Uma pandemia causada pelos vírus da influenza A ocorre quando uma estirpe é capaz de infectar e se alastrar de modo eficiente entre humanos carentes de imunidade para esta estirpe. Desde o final de 1990, a transmissão do vírus da influenza aviária às pessoas tem ocorrido em escala global, aumentando a preocupação de que a próxima pandemia poderá emergir à partir da interface homem-animal (KATZ, 2009).

Devido aos casos recentes de infecção em humanos causada por diversos subtipos, a influenza aviária é atualmente considerada uma significativa ameaça à Saúde Pública (CAPUA; ALEXANDER, 2007). Em relação ao HPAI H5N1, sabe-se até o momento que a transmissão ocorre de forma ineficiente entre aves e humanos, mas é possível que este mesmo vírus adquira a habilidade para se transmitir de forma eficiente e sustentada entre humanos. Apesar de não ser possível prever a evolução desta estirpe, sabe-se que haverá consequências devastadoras à população caso isso ocorra, uma vez que a letalidade pode chegar a 60% (FAO 2007; COX; UEKI, 2008). A OMS ainda cogita a possibilidade de ocorrer uma pandemia originada pelo subtipo H5N1. Neste caso, a mortalidade poderia chegar a 150 milhões de pessoas e afetar entre 20 e 50% da população mundial. A expansão de uma pandemia não pode ser impedida, mas é possível reduzir seu impacto caso o país esteja preparado e tenha um plano de emergência (WHO, 2004).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente projeto visa contribuir para o conhecimento da epidemiologia da influenza aviária no Brasil, em especial ao papel desempenhado pelas aves migratórias na circulação viral. Para tal, este trabalho utiliza como modelo de estudo as espécies pertencentes às ordens Anseriformes e Charadriiformes amostradas em áreas com elevada confluência migratória na região costeira da Amazônia.

3.2 ESPECÍFICOS

- i) Detecção dos vírus da influenza aviária (vírus da influenza A) através da *Real Time* RT-PCR em amostras colhidas de aves silvestres ao norte do estado do Pará, durante períodos cruciais de migração;
- ii) Determinação do subtipo viral envolvido nas amostras positivas ao *Real Time* RT-PCR, através do isolamento viral por inoculação em cavidade alantóide de ovos embrionados SPF (*Specific Pathogen Free*) e reações de inibição da hemaglutinação (HI) e da neuraminidase (NI);
- iii) Caracterização molecular das amostras positivas ao isolamento viral, através do sequenciamento dos nucleotídeos presentes nas regiões codificadoras da hemaglutinina (HA) e da neuraminidase (NA).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPEDIÇÕES CIENTÍFICAS

Foram conduzidas seis expedições científicas a três localidades no estado do Pará: i) Ilha de Canelas, no município de Bragança ($0^{\circ}47'7''$ S $46^{\circ}43'23''$ W), ii) parte continental do município de Bragança ($1^{\circ}2'27''$ S $46^{\circ}46'20''$ W), e iii) município de Tracuateua ($1^{\circ}4'43''$ S $46^{\circ}54'20''$ W) (Figura 7, Quadro 2). Apesar de a Ilha de Canelas fazer parte de Bragança, neste texto será adotado como “Bragança” apenas a parte continental deste município, visando facilitar a diferenciação das áreas amostradas.

Assim, estas áreas foram estrategicamente selecionadas por serem consideradas portas-de-entrada das aves migrantes setentrionais ao país (NUNES et al., 2006), das quais a maioria migra da América do Norte à partir de localidades conhecidas pela ocorrência dos vírus da influenza aviária (HANSON et al., 2008).

Figura 7 - Distribuição geográfica das três localidades amostradas (pontos em vermelho) em relação às rotas migratórias (linhas demarcadas em preto) e principais áreas de invernada (pontos em amarelo) e repouso (pontos em verde) utilizadas pelas aves migratórias na América do Sul

Fonte: Nunes et al. (2006), adaptação de Hurtado (2013)

Quadro 2 - Expedições científicas realizadas no estado do Pará

Expedição	Localidade	Datas das capturas
1	Ilha de Canelas	25 a 27/11/2008
2	Ilha de Canelas e Bragança	27 e 28/04/2009
3	Ilha de Canelas e Tracuateua	18 e 19/10/2009
4	Ilha de Canelas	16 a 18/12/2009
5	Ilha de Canelas	15/04/2010
6	Ilha de Canelas	09 e 10/11/2010

4.2 CAPTURA, MANEJO E COLHEITA DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS

As capturas e colheitas de material biológico foram feitas mediante a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (SISBIO nº 21211-1); ambas atividades foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA-USP nº 1752/2009).

As aves priorizadas neste projeto foram aquelas consideradas reservatórios para os vírus da influenza A, ou seja, as aves pertencentes às ordens Anseriformes e Charadriiformes e suas contactantes (STALLKNECHT; SHANE, 1988; WEBSTER et al., 1992; FOUCHIER et al., 2007; WEBSTER et al., 2007; SALOMON; WEBSTER, 2009; FEREIDOUNI et al., 2010; HANSBRO et al., 2010; DAOUST et al., 2011; GAIDET et al., 2012; BROWN et al., 2013).

Na Ilha de Canelas, 995 as aves foram capturadas em período noturno com auxílio de redes-de-neblina (*mist-nets*) feitas de *nylon*. Redes entre 7 e 12 metros de comprimento foram armadas em dois pontos estratégicos da ilha: i) área aberta e ii) área próxima à vegetação de mangue (Figura 8). Dez redes foram colocadas em cada ponto, em um esforço amostral de 6 a 8 horas diárias por expedição. Durante este período, as redes foram vistoriadas a cada 30-60 minutos para recolhimento das aves capturadas, que imediatamente foram acomodadas em sacos de pano individuais e levadas a uma base de campo para identificação, marcação, biometria e colheita de amostras. Ao término dos procedimentos, as aves foram liberadas nas mesma áreas de captura, mas afastadas das redes-de-neblina.

Noventa e oito aves silvestres pré-capturadas e mantidas em cativeiro pela população ribeirinha em Bragança e Tracuateua foram amostradas; tanto os Anseriformes como as outras espécies contactantes foram submetidas à colheita de amostras e devolvidas aos seus

“proprietários” em seguida (Figura 9). Nestes casos, a captura pôde ser realizada de forma manual, uma vez que estas aves estavam confinadas e com as rêmiges cortadas.

Figura 8 - Disposição das redes-de-neblina em (a) área aberta e (b) próxima ao manguezal

Figura 9 - Aves silvestres mantidas em cativeiro pela população ribeirinha nos municípios de Bragança e Tracuateua: (a) marreca-cabocla *Dendrocygna autumnalis* e marreca-irerê *Dendrocygna viduata*, e (b) colhereiro *Platalea ajaja*

A colheita de amostras foi apenas realizada por pesquisadores que faziam o uso de equipamentos de proteção individual (EPI), para evitar a possível transmissão de zoonoses e a contaminação das amostras. A identificação e biometria das espécies foram efetuadas em parceria com a equipe de ornitólogos liderada pelo Prof. Dr. Severino Mendes de Azevedo Júnior, professor associado da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Complementando as atividades em campo, os ornitólogos realizavam identificação, biometria (SCHULZ-NETO et al., 2008), marcação das aves através de anilhas de alumínio fornecidas pelo CEMAVE e tabulação dos dados em planilhas, para que o maior número de informação sobre os animais capturados fossem aproveitados neste estudo.

É sabido que os subtipos de AIV podem exibir tropismos teciduais distintos e serem preferencialmente excretados pela via respiratória ou digestiva (FEREIDOUNI et al., 2010; HOYE et al., 2010; PARMLEY et al., 2011; ZOWALATY et al., 2011; STALLKNECHT et al., 2012). Assim, optou-se pela colheita de ambas secreções orotraqueais e cloacais (Figura 10), em duplicata. Os *swabs* foram imediatamente transferidos para criotubos esterilizados contendo meio de transporte específico para conservação das partículas virais [425 μ L de tampão fosfato-salino autoclavado, 20 μ L de albumina sérica bovina, 50 μ L de glicerol, 4 μ L de penicilina 10.000 U/mL, 1 μ L de anfotericina (250 U/mL)] (WALLENSTEN et al., 2007). Em seguida, os criotubos foram acondicionados em nitrogênio líquido (-196 °C) até a chegada ao laboratório, onde foram transferidos e mantidos em freezer *ultralow* (-80 °C) até o processamento, seguindo rigorosamente os padrões internacionais (FAO, 2007; WHO, 2011).

Figura 10 - Colheita de *swabs* orotraqueal (a) e cloacal (b) em vira-pedras *Arenaria interpres*

4.3 ANÁLISES LABORATORIAIS

Todos os procedimentos laboratoriais relacionados à detecção dos vírus da influenza aviária (extração do material genético viral e *Real time* RT-PCR) foram realizados no Laboratório de Biossegurança nível 3+ (BSL3+) Klaus Eberhard Stewien do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Já os testes para caracterização viral das amostras positivas por *Real time* RT-PCR foram efetuadas na *Division of Virology* do *Department of Infectious Diseases* do *St. Jude Children's Research Hospital*, Memphis, Tennessee, EUA. Os protocolos laboratoriais de *Real time* RT-PCR, isolamento e caracterização viral utilizados neste estudo seguiram as recomendações das autoridades mundiais em pesquisa dos vírus da influenza A (FAO, 2007; WHO, 2011), bem como replicaram os principais estudos de monitoramento da influenza A em todo o mundo (SPACKMAN et al., 2002; KRAUSS et al., 2004; FOORD et al., 2009; FAIX et al., 2009; DELOGU et al., 2010; GILBERT et al., 2012; GONZÁLEZ-REICHE et al., 2012; HILL et al., 2012; GERLOFF et al., 2013).

4.3.1 Extração do material genético viral

O RNA viral foi extraído a partir do material biológico proveniente de *swab* orotraqueal e cloacal mantidos em meio de transporte, utilizando dois diferentes *kits*: *QIAamp® Viral RNA Mini Kit* (Qiagen®, Hilden, Alemanha) e *5X MagMAX™ 96 Viral Isolation Kit* (Invitrogen/Life Technologies™, Califórnia, Estados Unidos), seguindo as recomendações do fabricante (DELOGU et al., 2010). Como controle positivo das reações, foram utilizadas alíquotas de líquido alantóide de ovos embrionados inoculados com vírus da influenza A e inativados com β -propiolactona, gentilmente cedidas pelo Dr. Robert G. Webster (*Division of Virology, Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital*). Como controle negativo, foi utilizada água livre de nucleases. O material extraído foi armazenado em freezer *ultralow* (-80 °C) até a realização do *Real time* RT-PCR.

4.3.1.1 QIAamp® Viral RNA Mini Kit

Primeiramente, foi adicionado 560 µL de *Lysis Buffer* em 140 µL de amostra. Após incubação em temperatura ambiente por 10 minutos, foi acrescido 500 µL de etanol absoluto. Transferiu-se o conteúdo total de 1200 µL, em duas passagens de 600 µL cada, para a coluna fornecida no kit. Seguiu-se centrifugação a 6000 G por 1 minuto, descartou-se o líquido proveniente da centrifugação; 500 µL de *Buffer AW1* foi adicionado à coluna e centrifugado a 6000 G por 1 minuto. Após troca do tubo coletor dos líquidos provenientes da centrifugação, seguiu-se nova lavagem da coluna em centrifugação de 20000 G por 3 minutos com 500 µL do *Buffer AW2*. Transferiu-se a coluna para novo microtubo de 1.5 mL, adicionou-se 60 µL de *Buffer AVE*; para a retirada do material genético aderido à sílica, centrifugação a 6000 G por 2 minutos. O material extraído ficou diluído em 60 µL da solução e foi, em seguida, armazenado a -80 °C.

4.3.1.2 5X MagMAX™ 96 Viral Isolation Kit

A cada um dos poços da placa (*MME-96 Standard Plate*) foi adicionado 100 µL de amostra, 10 µL de *NA Binding Beads*, 10 µL de *RNA Lysis/Binding Enhancer* e 130 µL de *Lysis/Binding Solution Concentrate*, e homogeneizado. Em seguida, foram feitas duas lavagens sob agitação (600 rpm por 2 minutos, temperatura ambiente), utilizando 150 µL do reagente *Wash Solution 1* em cada poço. Em cada etapa, uma placa magnética foi colocada sob a microplaca por 1 minuto, para que as esferas metálicas (*beads*) ligadas ao RNA não fossem removidas durante as lavagens. Mais duas lavagens sob agitação (600 rpm por 2 minutos, temperatura ambiente) foram efetuadas, utilizando 150 µL do reagente *Wash Solution 2* para cada poço; novamente a placa metálica foi colocada sob a microplaca em todas as etapas da lavagem. Em seguida, 75 µL de *Elution Buffer* foi adicionado a cada poço e novamente agitado a 600 rpm por 3 minutos, visando separar o RNA que estava aderido às *beads* metálicas. O material extraído foi transferido a um microtubo livre de nucleases e armazenado a -80 °C.

4.3.2 Detecção viral

A detecção viral nas amostras colhidas foi realizada através da técnica de *Real Time* RT-PCR (SPACKMANN et al., 2002) com o kit *TaqMan AIV-Matrix Reagents* (Life Technologies™, Califórnia, Estados Unidos). Este kit é *One step* (as reações de transcrição reversa e PCR ocorrem no mesmo tubo) e utiliza *primers* específicos para a sequência genética do gene M (matriz), altamente conservada entre diferentes subtipos do vírus da influenza A. Assim, foram adicionados a cada poço da microplaca: 12.5 µL de *2x RT-PCR Buffer*, 1.0 µL de *25x AIV-Matrix Primer Probe Mix* (marcada com o fluorocromo FAM), 0.2 µL *Xeno™ RNA Control* diluído em água livre de nucleases (1:10), 1.0 µL de *25x RT-PCR Enzyme Mix*, 1.67 µL de *Detection Enhancer* e 8.63 µL de RNA extraído, totalizando 25 µL de volume final. As condições utilizadas no termociclador foram: temperatura inicial de 45 °C por 10 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e, para finalizar, 60 °C por 45 segundos.

Para verificar a confiabilidade da reação, também foram utilizados controles endógenos do kit (marcados com fluorocromo VIC) e controle da reação (marcado com fluorocromo ROX). A leitura dos produtos amplificados das amostras foi realizada no equipamento de *Real Time ABI 7300 PCR System* (Applied Biosystems®/ Life Technologies™), com auxílio do programa *7300 System SDS v1.4* (Applied Biosystems® Life Technologies™). O *threshold*, que é definido como o ponto de corte entre amostras positivas e negativas de acordo com a fluorescência emitida por cada amostra, foi definido automaticamente pelo programa, mas levemente ajustado para a fase exponencial da reação quando necessário.

4.3.3 Isolamento viral

O procedimento de inoculação em cavidade alantóide de ovos embrionados foi realizado em laboratório BSL2+ exclusivamente utilizado para esta técnica. Foram usados dois ovos embrionados SPF com 9 dias de vida para cada amostra a ser testada (A008, A017, A025, A051, A108, A117, A309, A498 e A804), totalizando 18 ovos.

Antes da inoculação das amostras, foi preparado um *mix* de antibióticos diluído em tampão fosfato-salino a 0.01 M e pH 7.2 (PBS) contendo: penicilina 4000 U/mL, estreptomicina 800 U/mL, polimicina B 400 U/mL, gentamicina 0.1 mg/mL, ofloxacina 0.024 mg/mL, trimetoprim 0.0024 mg/mL e sulfametoxazol 0.012 mg/mL.

Para evitar a contaminação cruzada entre amostras, foi efetuada uma inoculação por vez em fluxo laminar, com intervalo de três minutos entre amostras para garantir a renovação completa do ar. Assim, os procedimentos foram realizados em conformidade com protocolos estabelecido pela OMS (WHO, 2011), através das seguintes etapas: (i) observação dos ovos embrionados em ovoscópio para avaliação da viabilidade e descarte de embriões mortos ou com baixa mobilidade, bem como a delimitação da câmara de ar e identificação com o número da amostra; (ii) antissepsia da superfície dos ovos com etanol 70%; (iii) perfuração de um pequeno orifício na casca dos ovos; (iv) inoculação (em ângulo de 90°) de 0.1 mL de amostra (meio de transporte contendo os *swabs* orotraqueal e cloacal) + 0.1 mL do *mix* de antibióticos na cavidade alantóide de cada ovo através de agulha ultrafina esterilizada; (v) antissepsia da superfície dos ovos com etanol 70% e selamento do orifício com parafina líquida; (vi) incubação dos ovos em estufa sem CO₂ a 35 °C por 72 horas, e observação ao ovoscópio a cada 24 horas; (vii) refrigeração dos ovos a 4 °C (para levar à morte do embrião sem que ocorra autólise) e colheita do líquido alantóide.

A colheita do líquido alantóide também foi realizada em fluxo laminar, sendo colhidos aproximadamente 2 mL por ovo embrionado com o auxílio de pipetas *Pasteur* esterilizadas; o líquido alantóide dos dois ovos referentes a uma única amostra foi combinado para as análises posteriores. Uma alíquota foi utilizada para realização do teste para verificação de contaminação bacteriana e para a reação de hemaglutinação; o restante foi estocado em criotubos estéreis para uma nova inoculação (segunda passagem) em ovos embrionados.

A verificação de contaminação bacteriana foi realizada através da semeadura de uma pequena alíquota (aproximadamente 0.1 mL) do líquido alantóide em placas de Petri contendo meio ágar-sangue, que foram incubadas em estufa sem CO₂ a 35 °C por 72 horas, e observadas para o crescimento de colônias bacterianas.

4.3.4 Reação de hemaglutinação

A reação de hemaglutinação foi efetuada segundo o protocolo estabelecido pela OMS (WHO, 2011). Valendo-se de placa com 96 poços com fundo em “U”, foram realizadas diluições seriadas de amostras (pura, 1:2, 1:4) e dois controles de hemácias (Figura 11); as hemácias de galinha mantidas em solução de Alsever foram pré-lavadas e pré-diluídas em PBS a 0.5%. O preparo da placa foi efetuado através das seguintes etapas: (i) pipetagem de um estoque de amostra (cerca de 100 μ L do líquido alantóide de ovo embrionado inoculado) na linha A; (ii) pipetagem de 50 μ L de PBS nas linhas C a F; (iii) transferência de 50 μ L da linha A à linha B; (iii) pipetagem de 50 μ L da linha A à linha C; (iv) pipetagem de 50 μ L da linha C à linha D; (v) descarte de 50 μ L da linha D; (vi) pipetagem 50 μ L da solução de hemácias de galinha nas linhas B a F. Cada amostra foi feita em duplicata, utilizando-se duas colunas para tal. A placa foi selada com adesivo apropriado, homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos.

Para as amostras que obtiveram resultados positivos, isto é, aquelas em que ocorreu a hemaglutinação em algum dos poços das linhas B a D, a prova foi repetida com diluições seriadas de 1:2 a 1:2048, sendo o título definido pelo inverso da maior diluição de líquido alantóico capaz de apresentar atividade hemaglutinante.

Figura 11 - Diagrama da disposição das amostras e diluições para a reação de hemaglutinação. A figura ilustra que todos os poços da linha denominada como A receberam apenas amostras puras; os poços da linha B receberam amostras não-diluídas e hemácias a 0.5%; os poços da linha C receberam suas respectivas amostras diluídas a 1:2 em PBS e hemácias a 0.5%; os poços da linha B receberam suas respectivas amostras diluídas a 1:4 em PBS e hemácias a 0.5%; por último os poços da linha E e F receberam apenas PBS e hemácias a 0.5%

4.3.5 Reação de inibição da hemaglutinação

A reação de inibição da hemaglutinação foi realizada em placa de 96 poços com fundo em “U”, utilizando diluições seriadas de amostra (pura, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) (Figura 12). As hemácias de galinha mantidas em solução de Alsever foram pré-lavadas e pré-diluídas em PBS a 0.5%. Os antisoros foram previamente tratados com RDE (sigla em inglês para *Receptor-Destroying Enzyme*) e diluídos em PBS na proporção de 1:40. A solução de antígeno viral a ser testada foi preparada através da diluição da amostra a uma concentração de quatro unidades hemaglutinantes por 25 µL, conforme determinado pelo título da reação de hemaglutinação. O preparo da placa foi realizado através das seguintes etapas: (i) pipetagem de 50 µL de antisoro na linha A; (ii) transferência de 25 µL da linha A à linha B; (iii) transferência de 25 µL da linha B à linha C; (iv) transferência de 25 µL da linha C à linha D; (v) transferência de 25 µL da linha D à linha E; (vi) transferência de 25 µL da linha E à linha F; (vii) transferência de 25 µL da linha F à linha G; (viii) transferência de 25 µL da linha G à linha H; (ix) descarte de 25 µL da linha H; (x) pipetagem de 25 µL do antígeno viral padronizado a todos os poços.

Esta organização foi repetida em diferentes colunas para cada um dos antisoros contra os diferentes subtipos de HA; também foi incluso antisoro contra o *paramyxovirus* tipo 1 (NDV) (Quadro 3). Além disso, cada amostra foi testada em duplicata. A placa foi então homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 40 minutos. Em seguida, foi pipetado 50 µL da solução de hemácias de galinha em todos os poços. A placa foi selada com adesivo apropriado, homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 30 a 40 minutos. O título foi definido como o inverso da maior diluição de soro capaz de inibir completamente a atividade hemaglutinante viral (WHO, 2011).

Figura 12 - Diagrama da disposição das amostras e diluições realizadas durante a reação de inibição da hemaglutinação. A figura ilustra que todos os poços da linha denominada como A receberam antisoro puro e hemácias a 0.5%; as amostras nas linhas B a H receberam as diluições seriadas (amostras + PBS + hemácias a 0.5%) de 1:2 a 1:128

Quadro 3 - Antiseros utilizados para a reação de inibição da hemaglutinação

Subtipo de hemaglutinina	Estirpe viral
H1a	A/PR/8/34
H1b	A/FM/1/47
H1c	A/Swine/IA/15/30
H1d	A/Duck/Alberta/35/76
H2a	A/Japan/305/57
H2b	A/Gull/MD/19/77 (H2N9)
H3a	A/HK/1/68
H3b	A/Equine/Miami/1/63
H3c	A/Duck/Ukraine/1/63
H4	A/Duck/Shantou/461/2000 (H4N9)
H5	A/Tern/South Africa/61(H5N3)
H6a	A/Turkey/MA/65
H6b	A/Shearwater/Australia/1/73
H7a	A/Equine/Prague/1/56
H7b	A/FPV/Rostock/(H7N1)
H8	A/Turkey/Ontario/6118/68
H9	A/Turkey/MN/38391-6/95
H10	A/Chicken/Germany/N/49
H11a	A/Duck/England/56
H11b	A/Duck/Memphis/546/74
H12	A/Duck/Alberta/60/76
H13	A/Gull/MD/704/77
H14	A/Mallard/Astrakhan/263/82
H15	A/Shearwater/Australia/2576/79
H16	A/Shorebird/DE/172/2006
NDV	PMV-1 NDV/KS

4.3.6 Reação de inibição da neuraminidase

Esta reação foi efetuada em tubos de ensaio, segundo o protocolo determinado pela OMS (WHO, 2011). Como um dos objetivos do trabalho foi encontrar a NA envolvida, e não determinar sua titulação, apenas a reação de inibição da neuraminidase foi realizada. Assim, para cada amostra a reação ocorreu da seguinte forma:

- i) Pré-diluição dos antígenos de referência em PBS q.s.p. densidade óptica 0.500;
- ii) Diluição da amostra a 1:10 em PBS;
- iii) Diluição do antisoro a 1:100 em PBS;
- iv) Preparação de cinco tubos de ensaio para cada subtipo de NA: um para controle do antígeno de referência (50 µL antígeno de referência + 50 µL PBS), dois para o controle do antisoro de referência (50 µL de antisoro de referência + 50 µL de antígeno de referência) e dois para cada amostra a ser testada (50 µL amostra + 50 µL de antisoro de referência). Além destes, dois tubos foram utilizados para controle de amostra (50 µL amostra + 50 µL PBS);
- v) Homogeneização dos tubos e manutenção em temperatura ambiente por 30 minutos;
- vi) Adição de 100 µL de fetuin a cada tubo, selamento com filme plástico, homogeneização e incubação em banho-maria a 37 °C *overnight* (cerca de 15 horas);
- vii) Repouso dos tubos em temperatura ambiente por 2 minutos, seguido de adição de 100 µL de reagente periodato a cada um dos tubos; em seguida, homogeneização e manutenção por 20 minutos em temperatura ambiente;
- viii) Adição de 1 mL de reagente arsenito a cada tubo e homogeneização até o completo desaparecimento da coloração marrom; e
- ix) Adição de 2.5 mL de reagente ácido tiobarbitúrico em todos os tubos, homogeneização e incubação em água fervente por 15 minutos.

Para a interpretação dos resultados, a reação dos antígenos de referência (N1 a N9) com os antisoros de referência (Quadro 4) foi comparada à reação da amostra com os mesmos antisoros. Os tubos dos antígeno de referência ficaram com coloração rósea, indicando a presença de atividade da NA, enquanto os tubos com antígenos de referência e antisoros de

referência ficaram límpidos ou ligeiramente róseos, indicando que os anticorpos no soro inibiram a atividade de NA. A ausência ou redução significativa da coloração rósea nos tubos contendo a amostra e um antisoro de referência indicam que a atividade da NA foi inibida pelo antisoro de referência do subtipo de NA envolvido na amostra (Figura 13);.

Quadro 4 - Antisoros utilizados para a reação de inibição da neuraminidase

Subtipo de neuraminidase	Estirpe viral
N1	Equine 1-NJ/76
N2	A/Shorebird/DE/127/97
N3a	NWS-Tern/SA/61
N3b	NWS-Ty/England/63
N4	NWS-Ty/Ontario/6118/68
N5	NWS-Shearwater/Australia/73
N6	NWS-DK/England/56
N7	NWS-Equine/Prague/56
N8	NWS-Duck/Chabarovsk/1610/72
N9	A/Duck/GDR/72
NDV	PMV-1 NDV/KS

Figura 13 - Diagrama da disposição das amostras e diluições realizadas durante a reação de inibição da neuraminidase. A figura ilustra que a primeira fileira de tubos recebeu apenas o controle de antígeno de referência; cada um dos tubos da segunda e terceira fileiras receberam um dos nove tipos de NA pertencentes ao painel de antisoros de referência e cada um dos poços das quartas e quintas fileiras representam apenas uma amostra, a qual foi testada para cada um dos antisoros de referência. Neste caso, é ilustrado um resultado positivo para N6. Os dois tubos isolados dos demais representam os controles da amostra

4.3.7 Sequenciamento genético

O sequenciamento do tipo Sanger foi realizado nas amostras A008, A017 e A051; protocolos semelhantes foram utilizados para determinar a sequência genética das glicoproteínas HA e a NA.

4.3.7.1 RT-PCR

A primeira etapa do sequenciamento genético é a realização de RT-PCR, que foi feita através do *kit Superscript® One-step RT-PCR – System with Platinum® Taq Polymerase* (Invitrogen™). A mesma reação foi efetuada para ambos os genes NA e HA, diferenciada apenas pelo conjunto de *primers* utilizados (Quadro 5). Assim, foram adicionados a cada microtubo: 25 µL de *2x reaction mix*, 20 µL de água livre de nucleases, 2 µL de *Superscript II Real time Platinum Taq Polymerase mix*, 1 µL de *Primer Sense*, 1 µL de *Primer Anti-sense* e 1 µL de RNA extraído das amostras, totalizando 50 µL de volume final. A reação foi realizada sob as seguintes condições do termociclador: temperatura inicial de 50 °C por 50 minutos, 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos compreendidos por 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 68 °C por 2 minutos e, para finalizar, 68 °C por 7 minutos. Como controle positivo das reações, foi incluída uma amostra do vírus influenza A inativado com β-propiolactona e como controle negativo, foi utilizado água ultra-pura.

Quadro 5 - Sequências dos *primers* utilizados para RT-PCR das glicoproteínas HA e NA

Nome do primer	Sentido	Sequência	Posição no genoma
TF021	<i>Forward</i>	5' TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G 3'	Bm-HA-1
TF022	<i>Reverse</i>	5' ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT	Bm-NS-890R
TF019	<i>Forward</i>	5' TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG TC 3'	Bm-NA-1
TF020	<i>Reverse</i>	5' ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT CTT 3'	Bm-NA-1413R

Um gel de agarose a 1% com 10 µL de *GelRed™ Nucleic Acid Stain 10.000x in water* (Biotium Inc., California, EUA) foi preparado sob tampão Tris-Acetato EDTA (TAE). Para cada corrida foram utilizados 2 µL de *ladder* e 25 µL de cada amostra, sendo feita a corrida eletroforética a 150 volts por 45 minutos. A visualização das bandas resultantes (1778 bp para HA e 1413 bp para NA) foi realizada através de trans-iluminador com luz ultravioleta. As bandas foram recortadas com auxílio de lâminas de bisturi esterilizadas e transferidas a criotubos estéreis.

4.3.7.2 Purificação do DNA

O *Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare Life Sciences®, Buckinghamshire, Inglaterra) foi utilizado para a purificação do DNA e remoção de impurezas, adaptando superficialmente as instruções do fabricante. Primeiramente, foram adicionados 500 µL de *Capture Buffer Type 3* a cada criotubo, seguido de incubação a 60 °C por 10 minutos. Em seguida, todo o conteúdo foi transferido a uma coluna (*Microspin column*) acoplada a um tubo coletor e centrifugado a 16000 G por 30 segundos. O líquido do tubo coletor foi desprezado e 700 µL de *Wash Buffer Type 1* foram transferidos a cada coluna, seguindo-se centrifugação a 16000 G por 30 segundos. O líquido restante foi desprezado e uma nova centrifugação foi efetuada a 16000 G por 2 minutos. Após esta etapa, cada coluna foi transferida a um novo microtubo, no qual 40 µL de *Elution Buffer Type 6* foram adicionados ao centro da coluna. Após 2 minutos em temperatura ambiente foi realizada centrifugação a 16000 G por 2 minutos. As colunas foram descartadas e o DNA purificado foi armazenado a -20°C até o próximo procedimento.

4.3.7.3 Sequenciamento genético

Para determinar a sequência genética dos genes codificadores para HA e NA envolvidos nas amostras positivas por isolamento viral, diferentes *mix* foram efetuados. Para o HA, foram preparados cinco *mix* para cada amostra, e cada *mix* continha um dos *primers*

descritos no Quadro 6. Para o NA, sete *mix* foram preparados para cada amostra, e cada *mix* continha um dos *primers* descritos no Quadro 7. Assim, cada um dos tubos recebeu 2 µL de *primer* específico acrescido de 4 µL de água livre de nucleases e 4 µL de amostra purificada. Em seguida, as amostras foram submetidas às seguintes condições em termociclador: 25 ciclos constituídos por 96 °C por 30 segundos, 50 °C por 15 segundos e 60 °C por 4 minutos. Finalizada esta etapa, todos os tubos foram enviados ao *Hartwell Center* do *St. Jude Children's Research Hospital*, setor responsável pela re-purificação e análise cromatográfica das amostras. Assim, os produtos foram sequenciados utilizando o *Big Dye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies™), em conformidade com as instruções do fabricante; a detecção dos nucleotídeos marcados por fluorescência foi realizada no sequenciador automático *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®/Life Technologies™).

As sequências obtidas foram editadas manualmente através do pacote de programas DNASTAR Lasergene / *SeqMan Pro™* (<http://www.dnastar.com/>). Assim, os *contigs* referentes às amostras sequenciadas e analisadas foram alinhadas no programa MEGA 5.2.2 empregando o algoritmo *Clustal W* (TAMURA et al., 2011).

Para a construção filogenética foi efetuada uma busca do melhor modelo de substituição a ser empregado nas análises, sendo selecionado o modelo HKY+G+I (Hasegawa-Kishino-Yano com distribuição gama e invariância). Os critérios de máxima verossimilhança (ML, sigla em inglês para *maximum likelihood*) evolutiva foram realizados também através do programa MEGA 5.2.2. A árvore de ML com as sequências codificadoras para os respectivos genes da hemaglutinina e da neuraminidase foram geradas através de busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo *neighbor joining*; para verificar a sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas, análises de *bootstrap* com 500 pseudoréplicas (FELSENSTEIN, 1985) e reamostragem de 200 caracteres foram efetuadas. Os valores de *bootstrap* foram visualizados nas árvores filogenéticas através do programa FigTree (RAMBAUT, 2007), e os valores inferiores a 50% foram excluídos.

As sequências alinhadas foram utilizadas para calcular a distância genética intra-grupo para as estirpes virais pertencentes ao clado no qual as amostras deste estudo se inseriram, utilizando o programa MEGA 5.2.2.

Quadro 6 - Sequências dos *primers* utilizados para o sequenciamento do gene HA

Sequência	Posição no genoma
5' ATC AAT CAA GAA ATC AAA ATG GAG AA 3'	H11-40
5' GGA GTT CAC CAT CCT GCA ACT CT 3'	H11-580
5' TTC CTT TAG AGT TGC AGG ATG GTG 3'	H11-600R
5' GGT GCA ATA GCT GGT TTC ATA GAA GG 3'	H11-1060
5' AAC CAC CTT CTA TGA AAC CAG CTA TTG C 3'	H11-1080R
5' ACA GCT TCT CGT TTT ACT TGA AAA TGA 3'	H11-1330
5' CAT TTT CAA GTA AAA CGA GAA GCT GTG CA 3'	H11-1350R

Quadro 7 - Sequências dos *primers* utilizados para o sequenciamento do gene NA

Sequência	Posição no genoma
5' AAG TAG AGA ATT CAA TAA CTT GAC C 3'	N9-250
5' GGT CAA GTT ATT GAA TTC TCT ACT T 3'	N9-270R
5' AAG AGT CTG AAT GTG TAT GCC ACA AC 3'	N9-700
5' TGT GGC ATA CAC ATT CAG ACT CTT GTG TCC 3'	N9-730R
5' CTT ATC CGG GAA ATA ACA ACA ATG G 3'	N9-1040
5' CCA TTG TTG TTA TTT CCT GGG TAA GG 3'	N9-1060R
5' ACG ATA GGT CAA AGC CCA CTC AAG G 3'	N9-1180

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste Qui-Quadrado foi utilizado para determinar se a distribuição de indivíduos estudados era homogênea entre as ordens Anseriformes e Charadriiformes em função das três localidades de estudo.

A expressão “prevalência aparente” será aqui utilizada para se referir à frequência com que aves testadas obtiveram resultados positivos ao *Real Time* RT-PCR; é importante considerar que esta expressão é utilizada sem pressuposição de infalibilidade do teste diagnóstico e não se refere à população global ou nacional das aves estudadas.

O intervalo de 95% de confiança de Blaker foi utilizado para estimar a prevalência real (REICZIGEL et al., 2010) através da ferramenta digital EpiTools (SERGEANT, 2013). Para tal, foi utilizada a estimativa de Pregliasco et al. (1998) de que, para o diagnóstico do vírus da influenza aviária, a *Real time* RT-PCR possui sensibilidade (S) entre 89.1 e 100% e especificidade (E) de 100%. Embora Pregliasco et al. (1998) indiquem que a especificidade poderia ser inferior a 100% (mínimo 98.0%), estes valores produzem estimativas de prevalência real inferiores a 0% sendo, portanto, descartados.

Os testes exato de Fisher ($gl = 1$) ou Qui-Quadrado ($gl \geq 2$) foram utilizados para determinar se a distribuição de indivíduos com resultados positivos ao *Real time* RT-PCR era homogênea entre as espécies de aves, ordens taxonômicas, anos, estações e localidades. O teste exato de Fisher também foi utilizado para determinar se a distribuição de indivíduos com resultados positivos ao *Real time* RT-PCR era homogênea entre os grupos etários de *Arenaria interpres*.

A distribuição normal da massa corpórea dos espécimes de *A. interpres* foi verificada com o teste de Anderson-Darling, e o teste t de Student foi aplicado para comparar a massa corpórea entre indivíduos desta espécie que obtiveram resultados positivos e negativos ao teste de *Real time* RT-PCR.

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar o CT (sigla em inglês para *cycle threshold*) entre as amostras para as quais foi possível isolar o vírus e aquelas para as quais o isolamento viral não foi bem sucedido. O CT é definido pelo ciclo da PCR na qual a amostra passou no *threshold*. O nível de significância foi de 0.05 para todos os testes.

5 RESULTADOS

Foram examinadas um total de 1093 aves. Destas, 1071 aves foram identificadas pertencendo a 25 espécies em 12 famílias taxonômicas, e para outras 22 aves não foi possível registrar a espécie devido à contingências de campo; nestes casos, no entanto, foi possível determinar a ordem e/ou família. O Quadro 8 apresenta a distribuição do esforço amostral em relação às espécies de aves, localidades e expedições de campo. As cinco espécies mais frequentemente amostradas totalizaram 93.1% dos indivíduos deste estudo, sendo quatro espécies de Charadriiformes (412 *Calidris pusilla*, 307 *Actitis macularius*, 149 *Charadrius semipalmatus*, 43 *Arenaria interpres*) e uma espécie de Anseriformes (86 *Dendrocygna autumnalis*). Todas as aves amostradas estavam aparentemente saudáveis e não apresentavam quaisquer sinais clínicos sugestivos de doença.

A maioria das aves estudadas (98.0%) pertenceu às ordens Charadriiformes e Anseriformes. Há, no entanto, diferenças importantes na distribuição das aves destas ordens em função da localidade de estudo ($\chi^2 = 1059.053$, $gl = 2$, $P < 0.001$). A ordem Charadriiformes correspondeu à maioria das aves amostradas na Ilha de Canelas, totalizando 98.1% dos indivíduos estudados e não foram amostrados Anseriformes nesta localidade. Por outro lado, a ordem Anseriformes foi predominante em Bragança e Tracuateua, correspondendo respectivamente a 88.0% e 98.6% dos indivíduos amostrados, enquanto um único exemplar de Charadriiformes foi amostrado em Bragança. Além disso, as ordens Ciconiiformes, Coraciiformes, Passeriformes e Procellariiformes foram amostradas exclusivamente na Ilha de Canelas, enquanto a ordem Pelecaniformes foi amostrada apenas em Bragança e Tracuateua.

Quadro 8 - Distribuição do esforço amostral (N) e dos indivíduos identificados como positivos ao *Real time* RT-PCR (entre colchetes) em relação às espécies de aves, localidades e expedições de campo

(continua)

Ordem	Família	Espécie	Ilha de Canelas						Bragança	Tracuateua	Total
			1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	2 ^a	3 ^a	
Anseriformes	Anatidae	Marreca-ananai (<i>Amazonetta brasiliensis</i>)							1	1	2
		Marreca-cabocla (<i>Dendrocygna autumnalis</i>)							18	68	86
		Marreca-irerê (<i>Dendrocygna viduata</i>)							3	3 [1]	6 [1]
Charadriiformes	Charadriidae	Batuira-de-coleira (<i>Charadrius collaris</i>)		2		1	9				12
		Batuira-de-bando (<i>Charadrius semipalmatus</i>)	1	3	17	74 [1]	13	41			149 [1]
	Laridae	Gaivina-de-bico-preto (<i>Geochelidon nilotica</i>)	1								1
		Talha-mar (<i>Rynchops niger</i>)				1					1
	Scolopacidae	Maçarico-pintado (<i>Actitis macularius</i>)	30	24 [1]	19	81	89 [1]	64			307 [2]
		Vira-pedras (<i>Arenaria interpres</i>)	23 [4]	9		3	2	6			43 [4]
		Maçarico-branco (<i>Calidris alba</i>)	2		1	2					5
		Maçarico-de-papo-vermelho (<i>Calidris canutus</i>)					1				1
		Maçariquinho (<i>Calidris minutilla</i>)			2	5	1	2			10
		Maçarico-rasteiro (<i>Calidris pusilla</i>)	5	69	41 [1]	109	117	71			412 [1]
		Maçarico-de-costas-brancas (<i>Limodromus griseus</i>)	9	2				1			12
		Maçarico-galego (<i>Numenius phaeopus</i>)				1					1
		Maçarico-grande-de-perna-amarela (<i>Tringa melanoleuca</i>)	1								1
	Sternidae	Trinta-réis-de-bando (<i>Thalasseus sandvicensis</i>)							1		1
	Não identificada	Espécie não identificada				1	3	17			21

Quadro 8 - Distribuição do esforço amostral (N) e dos indivíduos identificados como positivos ao *Real time* RT-PCR (entre colchetes) em relação às espécies de aves, localidades e expedições de campo

Ordem	Família	Espécie	Ilha de Canelas						Bragança	Tracuateua	Total
			1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^a	2 ^a	3 ^a	
Ciconiiformes	Ardeidae	Garça-azul (<i>Egretta caerulea</i>)	1								1
Coraciiformes	Alcedinidae	Martim-pescador-grande (<i>Ceryle torquatus</i>)		1							1
		Martim-pescador-verde (<i>Chloroceryle amazona</i>)				1					1
Passeriformes	Fringillidae	Espécie não identificada	1								1
	Hirundinidae	Andorinha-das-chaminés (<i>Hirundo rustica</i>)	4								4
	Thraupidae	Figuinha-do-mangue (<i>Conirostrum bicolor</i>)	9	1							10
Pelecaniformes	Threskiornithidae	Guará-vermelho (<i>Eudocimus ruber</i>)								1	1
		Colhereiro (<i>Platalea ajaja</i>)							2		2
Procellariiformes	Procellariidae	Alma-de-mestre (<i>Oceanites oceanicus</i>)				1					1
Total			87 [4]	111 [1]	80 [1]	280 [1]	235 [1]	202	25	73 [1]	1093

(conclusão)

5.1 DETECÇÃO VIRAL

Em relação ao teste de *Real time* RT-PCR, amostras de nove indivíduos apresentaram resultados positivos, e o valor do CT variou entre 24 e 39 (Figura 14, Quadro 9). A prevalência aparente foi 0.82% (9 aves positivas / 1093 aves testadas), a partir da qual estimou-se que a prevalência real estaria entre 0.4% e 1.5% (S=100%, E=100%) ou entre 0.5% e 1.7% (S=89.1%, E=100%). Se considerada separadamente, a prevalência aparente para a Ilha de Canelas foi de 0.80% (8/995), com estimativas de prevalência real entre 0.3% e 1.6% (S=100%, E=100%) ou entre 0.4% e 1.8% (S=89.1%, E=100%).

A prevalência aparente não foi diferente em função da ordem e família taxonômica, localidade ou estação do ano (em todos os casos $P > 0.05$), porém, houve heterogeneidade significativa na prevalência esperada entre as cinco espécies de aves para as quais foram identificados positivos ($\chi^2 = 48.630$, gl = 4, $P < 0.0001$) e entre os três anos de amostragem ($\chi^2 = 17.169$, gl = 2, $P < 0.0002$) (Tabela 1). A massa corpórea foi semelhante entre os espécimes de *Arenaria interpres* que obtiveram resultados positivos (93.0 ± 2.6 g; n = 4) ou negativos (93.1 ± 11.3 g; n = 31) ($T = 0.04$, gl = 22, $P = 0.968$), e tampouco foi observada heterogeneidade significativa na positividade dos indivíduos de *Arenaria interpres* em função seu grupo etário (juvenil ou adulto) ($P=0.282$).

Figura 14 - Curvas de fluorescência das nove amostras positivas e do controle positivo ao *Real time* RT-PCR. As linhas tracejadas indicam as amostras em que o isolamento viral foi bem sucedido; a linha verde indica o *threshold*

Quadro 9 - Detalhes dos indivíduos cujas amostras obtiveram resultados positivos ao *Real time* RT-PCR

Amostra	Espécie	Idade	Massa (g)	Data	Localidade / Expedição	CT
A008	<i>Arenaria interpres</i>	Jovem	90	25/11/2008	Ilha de Canelas / 1 ^a	24
A017	<i>Arenaria interpres</i>	Jovem	94	25/11/2008	Ilha de Canelas / 1 ^a	28
A025	<i>Arenaria interpres</i>	Jovem	92	25/11/2008	Ilha de Canelas / 1 ^a	31
A051	<i>Arenaria interpres</i>	Jovem	96	26/11/2008	Ilha de Canelas / 1 ^a	24
A108	<i>Dendrocygna viduata</i>	Adulto	...	27/04/2009	Tracuateua / 2 ^a	34
A117	<i>Actitis macularius</i>	Adulto	61	28/04/2009	Ilha de Canelas / 2 ^a	34
A309	<i>Calidris pusilla</i>	Adulto	25	19/10/2009	Ilha de Canelas / 3 ^a	39
A498	<i>Charadrius semipalmatus</i>	Adulto	36	17/12/2009	Ilha de Canelas / 4 ^a	35
A804	<i>Actitis macularius</i>	Adulto	40	15/04/2010	Ilha de Canelas / 5 ^a	37

5.2 ISOLAMENTO E SOROTIPAGEM VIRAL

O isolamento viral foi bem sucedido em três das nove amostras com resultados positivos ao *Real time* RT-PCR. Estas três amostras pertenciam a exemplares da espécie *Arenaria interpres* amostrados na Ilha de Canelas durante a primeira expedição de campo (novembro de 2008).

As amostras para as quais o isolamento viral foi bem sucedido possuíam CT mediano de 24 ciclos, enquanto as amostras para as quais não foi possível o isolamento viral possuíam CT mediano de 34.5 ciclos ($W = 6.0$, $P = 0.0269$).

Os títulos à reação de hemaglutinação foram: 16 (A008), 8 (A017) e 32 (A051). As reações de inibição de hemaglutinação revelaram que as três amostras isoladas possuíam hemaglutinina subtipo H11 (A/Duck/Memphis/546/74), sob os títulos: 160 (A008 e A017) e 320 (A051). Todas as reações de inibição da neuraminidase demonstraram que o subtipo N9 (A/Duck/GDR/72) estava envolvido também nas três amostras positivas (títulos >100). Em função destes resultados e da localidade em que as amostras foram colhidas, sugere-se que as estirpes virais recebam as seguintes denominações (WHO, 1980):

- A/ruddy turnstone/Canelas Island/A008/2008/(H11N9)
- A/ruddy turnstone/Canelas Island/A017/2008/(H11N9)
- A/ruddy turnstone/Canelas Island/A025/2008/(H11N9)

Tabela 1 - Prevalência aparente do vírus da influenza A segundo a técnica de *Real time* RT-PCR em relação a diferentes características do histórico individual ou contexto de amostragem

Critério de agrupamento	Prevalência aparente	Número de aves positivas	Número de aves testadas
Ordem taxonômica (P = 0.804)			
Anseriformes	1.06%	1	94
Charadriiformes	0.82%	8	977
Família taxonômica (P = 0.895)			
Anatidae	0.65%	2	307
Charadriidae	0.62%	1	161
Scolopacidae	0.88%	7	792
Espécie (P < 0.001)			
<i>Actitis macularius</i>	0.65%	2	307
<i>Arenaria interpres</i>	9.30%	4	43
<i>Calidris pusilla</i>	0.24%	1	412
<i>Charadrius semipalmatus</i>	0.67%	1	149
<i>Dendrocygna viduata</i>	16.67%	1	6
Localidade (P = 0.610)			
Ilha de Canelas	0.80%	8	995
Tracuateua	1.37%	1	73
Estação do ano (P=0.969)			
Outono/Saída (2ª e 5ª expedições)	0.80%	3	371
Primavera/Chegada (1ª, 3ª, 4ª e 6ª expedições)	0.83%	6	722
Ano (P < 0.001)			
2008 (1ª expedição)	4.60%	4	87
2009 (2ª, 3ª e 4ª expedições)	0.70%	4	569
2010 (5ª e 6ª expedições)	0.23%	1	437

5.3 SEQUENCIAMENTO GENÉTICO

As árvores filogenéticas para os genes codificadores para HA (Figura 15) e NA (Figura 16) demonstraram que as estirpes virais identificadas neste estudo (em vermelho) agruparam-se em um clado bem definido (ramos em azul) com aquelas provenientes de Charadriiformes do estado de New Jersey, Estados Unidos, em especial *Arenaria interpres* (“ruddy turnstone”). Estes clados foram sustentados com altos valores de *bootstrap* (100%) para ambos genes, e a distância genética intra-clado foi de 0.7% para HA e 0.6% para NA. Destacam-se, ainda, as sequências de duas estirpes virais de H11N9 identificadas em *A. interpres* em maio de 2008 também em New Jersey (em verde).

Figura 15 - Árvore filogenética do gene codificador para HA proveniente das estirpes virais identificadas neste estudo (em vermelho) foram agrupadas em clado bem definido (ramos em azul) com àquelas identificadas em Charadriiformes na América do Norte. Em verde, destacam-se as sequências de estirpes de H11N9 identificadas em *A. interpres* em maio de 2008 em New Jersey.

Figura 16 - Árvore filogenética do gene codificador para HA proveniente das estirpes virais identificadas neste estudo (em vermelho) foram agrupadas em clado bem definido (ramos em azul) com àquelas identificadas em Charadriiformes na América do Norte. Em verde, destacam-se as sequências de estirpes de H11N9 identificadas em *A. interpres* em maio de 2008 em New Jersey.

6 DISCUSSÃO

Pela técnica de *Real time* RT-PCR, este estudo detectou a presença do vírus da influenza em nove das 1093 aves aquáticas amostradas no estado do Pará, revelando uma prevalência aparente de 0.82%. Com base neste resultado e no desempenho diagnóstico da *Real time* RT-PCR, é possível estimar com 95% de confiança que a prevalência real do vírus esteja entre 0.4% e 1.7%.

Alguns estudos relatam que, por esta mesma técnica, a prevalência aparente global de AIV em aves silvestres varia entre 1 e 2% (GHERSI et al., 2009; SAMBIEDA et al., 2010; GONZÁLEZ-REICHE et al., 2012; LEWIS et al., 2013). Apesar disso, sabe-se que esta prevalência pode ser bastante variável em decorrência do local de amostragem, época do ano, espécie, idade e método diagnóstico (IP et al., 2008, 2012; GONZÁLEZ-REICHE et al., 2012). Avaliando-se as famílias separadamente, a prevalência aparente foi 0.88% em Scolopacidae e 1.06% em Anatidae. Os resultados corroboram os achados de Olsen et al. (2006), que estimaram a prevalência aparente mundial em 0.80% (21/2637) para Scolopacidae; por outro lado, o mesmo estudo revelou uma prevalência consideravelmente mais elevada para Anatidae, de 9.49% (3275/34503).

O vírus da influenza A foi detectado em cinco espécies neste estudo: *Actitis macularius*, *Arenaria interpres*, *Calidris pusilla*, *Charadrius semipalmatus* e *Dendrocygna viduata*. Destas, apenas *Actitis macularius* constitui um registro inédito e, embora esta tenha sido a segunda espécie mais frequentemente amostrada neste trabalho, é relativamente pouco representada em estudos publicados. Por exemplo, uma série de estudos conduzidos entre 1999 e 2005 nos Estados Unidos revelaram que apenas cinco dos 9.402 maçaricos capturados pertenciam à espécie *A. macularius* (HANSON et al., 2008). Por outro lado, apesar deste ser o primeiro registro de AIV em *Dendrocygna viduata* no continente sul-americano, estudos realizados em diferentes países africanos revelam que esta espécie é um dos Anatidae com maior prevalência aparente dos vírus da influenza A naquele continente (GAIDET et al., 2007).

Não há estudos publicados acerca da ocorrência de AIV em Charadriiformes no Brasil. Os achados preliminares de um estudo conduzido pelo Ministério da Saúde no estado do Rio Grande do Norte em 2003, no entanto, revelam a presença do vírus da influenza A nas mesmas espécies deste estudo (*Calidris pusilla*, *Charadrius semipalmatus* e *Arenaria*

interpres), exceto *Actitis macularius*. Através do isolamento viral a partir de amostras provenientes de *swabs* cloacais, apenas o subtipo H3 foi encontrado (SVS, 2004). Além disso, as mesmas espécies também têm sido identificadas com AIV na América do Norte. Em Delaware Bay, Hanson et al. (2008) observaram que 0.91% (4/431) dos *Charadrius semipalmatus* eram positivos para o vírus, enquanto Krauss et al. (2004) e Stallknecht et al. (2012) também demonstraram a presença do vírus da influenza A em *Calidris pusilla* durante estudos de longo prazo.

Apesar de terem sido amostrados apenas 43 *Arenaria interpres* neste estudo, esta espécie foi responsável por cerca de 45% (4/9) dos resultados positivos encontrados. Com isto, a prevalência aparente dos vírus da influenza A nesta espécie é de 9.30% (4/43), contrastando consideravelmente com a prevalência aparente de 0.82% constatada para a totalidade das aves amostradas (9/1093). Um estudo conduzido por Hanson et al. (2008) entre 2000 e 2005 em Delaware Bay demonstrou uma prevalência aparente de 11.06% (262/2368) de AIV nesta espécie, ao passo que em outros Charadriiformes (e.g., *Leucophaeus atricilla*, *Limnodromus griseus*, *Calidris alpina*, *Calidris alba*, *Calidris canutus*) a prevalência variou entre 0.3 e 1.1%. Além disso, também foi possível notar que 262 das 292 aves silvestres positivas para AIV (89.73%) pertenciam a *Arenaria interpres*. Stallknecht et al. (2012) também demonstraram uma prevalência aparente marcadamente mais elevada nesta espécie: entre 2006 e 2009, a prevalência foi de 12.84% (278/2165) em *Arenaria interpres*, em contraste a 7.01% (319/4552) entre todos os Charadriiformes; portanto, 87.14% dos positivos desta ordem correspondiam a esta espécie.

Os fatores que levam a *Arenaria interpres* a apresentar uma prevalência aparente de AIV muito superior às outras espécies de Charadriiformes ainda são desconhecidos. Acredita-se que diferenças no comportamento alimentar dos maçaricos podem influenciar o número de infectados, tendo em vista que a *A. interpres* é uma das poucas espécies que consome carcaças e restos de comida. Além disso, estas aves possuem um bico forte que lhes permite revirar pedras, conchas, galhos e plantas aquáticas em busca de alimentos; também podem ser vistas forrageando em áreas consideradas pouco naturais (como estacionamento, por exemplo). Estes fatores facilitariam a exposição a patógenos que não são facilmente encontrados em praias e estuários, permitindo-lhes ocupar um nicho ecológico diferenciado entre os Charadriiformes (HANSON et al., 2008).

Com relação à sazonalidade dos vírus da influenza A, não houve diferença significativa entre o número de aves positivas por *Real time* RT-PCR nas duas épocas do ano

amostradas (outubro-dezembro e fevereiro-abril). Diversos estudos demonstram maior frequência na detecção de AIV em Anseriformes e Charadriiformes durante a primavera e outono, períodos nos quais a maioria destas espécies se concentra em grandes números antes iniciar a migração (HANSON et al., 2008; BREED et al., 2010; KRAUSS et al., 2010; LEWIS et al., 2013). Como as expedições deste estudo foram realizadas apenas durante os meses em que as aves estão chegando e saindo do Brasil, já era esperada uma prevalência similar entre estes dois períodos. É preciso ressaltar, ainda, que os Anatidae amostrados nas comunidades de Bragança e Tracuateua não são classificados como migrantes setentrionais, além de estarem em cativeiro, inviabilizando interpretações de sazonalidade relacionada à migração.

Com relação à variação interanual, nota-se uma prevalência aparente mais elevada em 2008 (4.60%) em comparação aos demais anos de estudo (0.23% a 0.70%). É provável que esta discrepância esteja relacionada a um viés de amostragem na primeira expedição (novembro de 2008), não refletindo uma real tendência temporal da prevalência na região. Ao analisar as saídas de campo separadamente, a prevalência aparente dos vírus da influenza A durante a primeira expedição seria de 4.60% (4/87), em contraste aos 0.35% a 1.25% (5/1006) registrados nas demais expedições. Uma possível explicação é o fato de que a primeira expedição correspondeu a uma maior amostragem de *Arenaria interpres*, sendo que mais da metade dos exemplares desta espécie amostrados neste estudo (23/43) foram capturados nesta saída de campo. Estes dados corroboram observações anteriores de que a prevalência de AIV em uma determinada localidade pode estar intimamente correlacionada à presença de uma espécie na qual a prevalência é particularmente elevada (FOUCHIER et al., 2007), como é sabidamente o caso de *A. interpres* (KAWAOKA et al., 1988; HANSON, 2008; STALLKNECHT; BROWN, 2008; STALLKNECHT et al., 2012).

Diversos trabalhos apontam que a prevalência do vírus da influenza A é muito superior em Anseriformes juvenis do que em adultos (STALLKNECHT et al., 1990b; ALFONSO et al., 1995; HANSON et al., 2003; OLSEN et al., 2006; SAMBIEDA et al., 2010), enquanto esta relação está menos estabelecida para Charadriiformes (HANSON et al., 2008; KRAUSS et al., 2010). Neste estudo, não foi possível correlacionar a prevalência aparente de AIV com a idade das aves amostradas em função do baixo número de indivíduos positivos.

Hanson et al. (2008) encontraram uma prevalência aparente consideravelmente mais elevada em *Arenaria interpres* com maior massa corporal (13 a 16% em indivíduos com 102-

145 g e 3% em indivíduos com massa inferior a 102 g). No presente estudo, no entanto, constatou-se que os espécimes de *A. interpres* positivos e negativos para os AIV apresentavam massas corpóreas muito próximas, relativamente baixas (93 g).

O isolamento viral foi possível em três das nove amostras positivas ao *Real time* RT-PCR, revelando uma taxa de sucesso de 33.3%. Semelhantemente, Munster et al. (2007) obtiveram uma taxa de isolamento de 33.5% em amostras de Anseriformes positivas ao *Real time* RT-PCR. Estas taxas relativamente baixas são compatíveis com a literatura existente para os vírus da influenza A, uma vez que é sabido que a taxa de detecção da *Real time* RT-PCR tende a ser muito superior à do isolamento viral (HURT et al., 2006; FERRO et al., 2010; GONZÁLEZ-REICHE et al., 2012; HILL et al., 2012).

Sabe-se que inúmeros fatores podem influenciar o sucesso do isolamento viral, sendo que a ausência de partículas virais viáveis e a quantidade insuficiente de vírus para causar infecção no embrião são os mais importantes a se considerar (SPACKMAN et al., 2008; STALLKNECHT et al., 2012).

Em especial, um fator que pode influenciar a taxa de isolamento em ovos embrionados é o valor do CT (*cycle threshold*) obtido na *Real time* RT-PCR: quanto maior o CT, menor o sucesso de isolamento viral. Isto se deve ao fato de que valores mais elevados do CT indicam menor quantidade de partículas virais na amostra (MUNSTER et al., 2007; LEWIS et al., 2013). Neste estudo, as amostras referentes às três únicas aves em que o isolamento viral foi bem sucedido possuíam CT entre 24 e 28, enquanto aquelas em que não foi obtido sucesso a esta prova possuíam CT consideravelmente mais elevado (31 a 39). Este achado é corroborado por Stallknecht et al. (2012), que demonstraram que em amostras cujo CT encontrava-se entre 25 e 29.9 a taxa de sucesso de isolamento viral foi 82% (9/11), enquanto as amostras com CT superior a 30 apresentavam taxa de isolamento viral de 16% (10/62).

Além disso, vale ressaltar que entre as nove amostras submetidas ao isolamento viral, as três únicas positivas foram aquelas provenientes de *Arenaria interpres*, sugerindo a presença de maior quantidade de partículas virais em secreções orotraqueais e cloacais nas aves desta espécie.

A caracterização das amostras isoladas revelou pertencerem ao subtipo H11N9. Segundo a classificação proposta pela OMS, estas estirpes são consideradas de baixa patogenicidade (LPAI) (WHO, 1980), mantendo o status do Brasil em ser considerado livre dos vírus influenza da aviária altamente patogênicos (HPAI).

A glicoproteína H11 tem sido identificada em amostras de Charadriiformes em diferentes países com relativa frequência (HURT et al., 2006; FOUCHIER et al., 2007; KRAUSS et al., 2007; STALLKNECHT; BROWN, 2008; BORM et al., 2012; STALLKNECHT et al., 2012; LEWIS et al., 2013). Em um estudo realizado ao longo de 16 anos em Delaware Bay, por exemplo, H11 foi o segundo subtipo mais isolado em maçaricos, sendo registrado em 15.4% destas aves (KRAUSS et al., 2004). A ampla variedade de subtipos de NA que tem sido relatada nos estudos dificulta a determinação de quais são mais prevalentes. No entanto, o N9 não aparenta ser incomum e tem sido encontrado em Charadriiformes nas Américas do Norte e Sul, e Europa (KRAUS et al., 2004, 2007; HURT et al., 2006, PEREDA et al., 2008; GHERSI et al., 2009; SAMBIEDA et al., 2010; SENNE, 2010; GOEKJIAN et al., 2011). A combinação de glicoproteínas H11N9 já foi descrita em Charadriiformes na América do Norte; em 2001, este mesmo subtipo foi isolado em 11 maçaricos (espécies não-relatadas) durante um estudo realizado em Delaware Bay, New Jersey (HANSON et al.; 2008).

Além da semelhança no subtipo viral e nas espécies infectadas, os resultados de sequenciamento genético também corroboram que aves migratórias possam ser um importante elo de conexão epidemiológica entre o Brasil e a América do Norte. Em particular, as estirpes virais identificadas neste estudo apresentaram elevada semelhança genética (clados com *bootstrap* 100%; distância intra-clado de 0.5% para HA e 0.6% para NA) entre as amostras de Charadriiformes no Brasil e em New Jersey.

Além disso, os registros obtidos no *Influenza Research Database* (www.fludb.org) revelaram que em maio de 2008 dois indivíduos pertencentes à espécie *Arenaria interpres* foram identificados com o subtipo viral H11N9 em New Jersey (A/ruddy turnstone/NewJersey/Sg-00561/2008 e A/ruddyturnstone/NewJersey/Sg-00564/2008) (marcados em verde nas Figuras 15 e 16), os quais apresentaram elevada similaridade genética com aquelas identificadas neste estudo em *A. interpres* capturadas no Brasil apenas seis meses mais tarde (novembro de 2008).

Ainda não é possível determinar se a maior frequência do AIV em *Arenaria interpres* indicaria que esta espécie desempenha um papel determinante na circulação viral entre as Américas do Norte e do Sul, mas isto pode ser considerado plausível face à elevada prevalência observada em diferentes estudos e às migrações de longa distância que estas aves são capazes de realizar. No entanto, não se deve descartar que outros maçaricos, como por exemplo *Calidris canutus*, podem sabidamente transitar do estado de New Jersey à costa do

Pará e vice-versa (NILES et al., 2010) e também são suscetíveis à infecção pelo AIV (MAXTED et al., 2012).

Apesar de os vírus da influenza aviária serem constantemente estudados em outros países, a vigilância epidemiológica em aves silvestres no Brasil ainda é deficiente, implicando em reduzido conhecimento acerca da prevalência viral e subtipos circulantes, bem como do papel desempenhado pelas aves migratórias na ecologia global dos AIV.

Os hábitos de captura e manutenção de aves silvestres em cativeiro, comumente observados em comunidades ribeirinhas ao norte do Pará, podem favorecer a transmissão dos vírus da influenza A. Estas aves, além de manterem intenso contato com as pessoas, também compartilham o espaço físico com diferentes espécies de mamíferos (primatas, suínos, cães e gatos) e aves domésticas (galinhas, perus e patos), muitas delas conhecidas pelo importante papel na transmissão e/ou rearranjo viral dos AIV (KUIKEN et al., 2004; OLSEN et al., 2006; WANG; PALESE, 2009; BAO et al., 2013). Além disso, o estresse causado pelo confinamento, associado às condições sanitárias inadequadas e dieta deficiente, pode predispor a manifestação de doenças e liberação de maiores cargas virais em fezes e secreções (SWAYNE, 2008a).

É preciso considerar ainda que, embora relativamente incomuns, há registros de surtos de HPAI envolvendo alta mortalidade de aves silvestres (BEKER, 1966; LIU et al., 2005; FOUCHIER et al., 2007). Como a Amazônia é considerada uma das florestas mais ricas em avifauna do mundo (SICK, 2001), um surto desta natureza poderia causar impactos bastante significativos em diferentes populações de aves silvestres. Pode-se destacar, por exemplo, que o município de Bragança abriga um dos maiores ninhais de guará-vermelho (*Eudocimus ruber*) da América do Sul (SOUZA et al., 2008), e que a mortalidade em massa destas aves durante um surto de influenza aviária poderia trazer graves consequências para a conservação desta espécie.

Assim, algumas medidas para minimizar os riscos e impactos de surtos e auxiliar a elaboração de um plano de controle eficiente do vírus da influenza A no Brasil podem ser consideradas, como:

- i) vigilância epidemiológica de populações humanas, principalmente nas comunidades afastadas dos serviços públicos de saúde e em áreas de elevada confluência migratória de aves;
- ii) vigilância epidemiológica contínua de aves silvestres e domésticas;

- iii) elaboração de parcerias com instituições internacionais de vigilância epidemiológica, sobretudo aquelas que realizam estudos na América do Norte;
- iv) restrição à instalação de granjas avícolas e de suinocultura em proximidade às áreas de repouso e invernada de aves migratórias;
- v) restrição às atividades agropecuárias em Parques Nacionais e suas proximidades;
- vi) educação ambiental em comunidades afastadas, visando a diminuição das práticas de captura e manutenção de aves silvestres em cativeiro, bem como a conscientização dos riscos sanitários envolvidos nestas atividades;
- vii) estabelecimento de planos regionais de contingência para o controle e prevenção da disseminação do vírus da influenza aviária em caso de pandemia ou epidemias na região ou no Hemisfério Norte.

7 CONCLUSÃO

- i) A detecção e o isolamento dos AIV em aves migratórias sugerem a circulação do vírus na região Norte do Brasil, existindo a possibilidade de serem carreados ou mantidos nas diferentes populações de aves aquáticas;
- ii) A técnica de *Real time* RT-PCR se mostrou bastante eficiente em estudos de vigilância epidemiológica utilizando material biológico proveniente de aves silvestres assintomáticas. Sua sensibilidade elevada quando comparada a outros métodos diagnósticos pôde ser demonstrada através da detecção do vírus da influenza A em amostras com baixa concentração viral;
- iii) O subtipo H11N9 isolado neste estudo corrobora a manutenção do status do Brasil em ser considerado livre dos vírus da influenza aviária altamente patogênicos;
- iv) O resultado do sequenciamento genético revelou uma estreita relação filogenética entre as estirpes virais deste estudo e aquelas isoladas na América do Norte, evidenciando a conectividade entre estas populações e, conseqüentemente, o estabelecimento de um vínculo epidemiológico;
- v) Este estudo demonstra a necessidade de contínua vigilância epidemiológica dos AIV em aves silvestres na região amazônica, a fim de obter informações sobre a prevalência dos vírus nestas populações e os subtipos circulantes, permitindo maior eficácia das medidas de prevenção e controle da influenza aviária no Brasil.

REFERÊNCIAS

ABAO, L. N. B.; JAMSRANSUREN, D.; BUI, V. N.; NGO, L. H.; TRINH, D. Q.; YAMAGUCHI, E.; VIJAYKRISHNA, D.; RUNSTADLER, J.; OGAWA, H.; IMAI, K. Surveillance and characterization of avian influenza viruses from migratory water birds in eastern Hokkaido, the northern part of Japan, 2009-2010. **Virus Genes**, v. 46, p. 323-329, 2013.

ABEF. Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango. **História da avicultura no Brasil**, 2013. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/>>. Acesso em: 05 set. 2013.

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.

ALFONSO, C. P.; COWEN, B. S.; CAMPEN, H. V. Influenza A viruses isolated from waterfowl in two wildlife management areas of Pennsylvania. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 31, n. 2, p. 179-185, 1995.

ANTAS, P. T. Z. Migration of nearctic shorebirds (Charadriidae and Scolopacidae) in Brazil – flyways and their different seasonal use. **Wader Study Group Bulletin**, v. 39, p. 52-56, 1983.

ANTAS, P. T. Z. Migração de aves no Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL DE ANILHADORES DE AVES, 2; 1986, Rio de Janeiro, **Anais...** Rio de Janeiro: UFRJ, 1986, p. 153.

ARSNOE, D. M.; IP, H. S.; OWEN, J. C. Influence of body condition on influenza A virus infection in mallard ducks: experimental infection data. **PLOS ONE**, v. 6, n. 8, p. 1-9, 2011.

AZEVEDO-JÚNIOR, S. M. de; DIAS-FILHO, M. M.; LARRAZÁBAL, M. E. de Plumagens e mudas de Charadriiformes no litoral de Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 18, n. 3, p. 657-672, 2001.

AZEVEDO-JÚNIOR, S. M. de; DIAS-FILHO, M. M.; LARRAZÁBAL, M. E. de; FERNANDES, C. J. G. Capacidade de voo de quatro espécies de Charadriiformes (Aves)

capturadas em Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19, p. 183-189, 2002.

BALTIMORE, D. Expression of animal virus genome. **Bacteriological Reviews**, v. 35, n. 3, p. 235-241, 1971.

BAO, Chang-jun; CUI, Lun-biao; ZHOU, Ming-hao; HONG, L.; GAO, G. F.; WANG, H. Live-animal markets and influenza A (H7N9) virus infection. **The New England Journal of Medicine**, v. 368, p. 2337-2339, 2013.

BEARE, A. S.; WEBSTER, R. G. Replication of avian influenza viruses in humans. **Archives of Virology**, v. 119, n. 1-2, p. 37-42, 1991.

BECKER, W. B. Isolation and classification of tern virus: Influenza virus A/Tern/South Africa/1961. **Journal of Hygiene**, v. 64, p. 309-320, 1966.

BERTHOLD, P. Geographic variation and microevolution of avian migratory behaviour. In: FOSTER, S. A.; ENDLER, J. A. **Geographic variation in behavior: perspectives on evolutionary mechanisms**. New York: Oxford University Press, 1999. p. 164-179.

BEVERIDGE, W. I. B. The chronicle of influenza epidemics. **Historical and Philosophic Life Sciences**, v. 13, p. 223-235, 1991.

BIRNBAUM, N. G.; O'BRIEN, B. Methods for inactivation of avian influenza virus in the environment. In: SWAYNE, D. E. **Avian influenza**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 391-407.

BOERE, G. C.; STROUD, D. A. The flyway concept: what it is and what it isn't. **Waterbirds around the world**, 2006. Disponível em: <http://jncc.defra.gov.uk/PDF/pub07_waterbirds_part1_flywayconcept.pdf>. Acesso em: 26 out. 2011.

BORM, S. V.; ROSSEEL, T.; VANGELUWE, D.; VANDENBUSSCHE, F.; van den BERG, T. Phylogeographic analysis of avian influenza viruses isolated from *Charadriiformes* in Belgium confirms intercontinental reassortment in gulls. **Archives of Virology**, v. 157, p. 1509-1522, 2012.

BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 26, n. 4, p. D49-D53, 2008.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Influenza aviária**, 2006. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/programa%20nacional%20sanidade%20avicola/perguntas%20frequentes.pdf>. Acesso em: 15 de out. 2013.
- BREED, A. C.; HARRIS, K.; HESTERBERG, U.; GOULD, G.; LONDT, B. Z.; BROWN, I. H.; COOK, A. J. C. Surveillance for avian influenza in wild birds in the European Union in 2007. **Avian Diseases**, v. 54, p. 399-404, 2010.
- BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. Porto Alegre: AMGH, 2012. 813 p.
- BROWN, J. D.; STALLKNECHT, D. E.; VALEIKA, S.; SWAYNE, D. E. Susceptibility of wood ducks to H5N1 highly pathogenic avian influenza virus. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 4, p. 660-667, 2007.
- BROWN, J. D.; GOEKJIAN, G.; POULSON, R.; VALEIKA, S.; STALLKNECHT, D. E. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. **Veterinary Microbiology**, v. 136, p. 20-26, 2009.
- BROWN, V. L.; DRAKE, J. M.; STALLKNECHT, D. E.; BROWN, D. L.; PEDERSEN, K.; ROHANI, P. Dissecting a wildlife disease hotspot: the impact of multiple host species, environmental transmission and seasonality in migration, breeding and mortality. **Journal of the Royal Society**, v. 10, n. 79, p. 1-12, 2013.
- CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. Animal and human health implications of avian influenza infections. **Bioscience Reports**, v. 27, p. 359-372, 2007.
- CAPUA, I.; TERREGINO, C. Clinical traits and pathology of avian influenza infections, guidelines for farm visit and differential diagnosis. In: CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. **Avian Influenza and Newcastle disease**. Milan: Spring-Verlag, 2009. p. 45-72.
- CHEN, Z.; KRUG, R. M. Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. **Trends in Microbiology**, v. 8, n. 8, p. 376-383, 2000.
- CHEN, H.; SMITH, G. J. D.; LI, K. S.; WANG, J.; FAN, X. H.; RAYNER, J. M.; VILAYKRISHNA, D.; ZHANG, J. X.; ZHANG, L. J.; GOU, C. T.; CHEUNG, C. L.; XU, K. M.; DUAN, L.; HUANG, K.; QIN, K.; LEUNG, Y. H. C.; WU, W. L.; LU, H. R.; CHEN, Y.; XIA, N. S.; NAIPOSPOS, T. S. P.; YUEN, K. Y.; HASSAN, S. S.; BAHRI, S.; NGUYEN, T. D.; WEBSTER, R. G.; PEIRIS, J. S. M. GUAN, Y. Establishment of multiple sublineages of H5N1 influenza virus in Asia: implications for pandemic control. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 8, p. 2845-2850, 2006a.

CHEN, H. X.; SHEN, H. G.; LI, X. L.; ZHOU, J. Y.; HOU, Y. Q.; GUO, J. Q.; HU, J. Q. Seroprevalence and identification of influenza A virus infection from migratory wild waterfowl in China (2004-2005). **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 53, p. 166-170, 2006b.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Global epidemiology of influenza: past and present. **Annual Review of Medicine**, v. 51, p. 407-421, 2000.

COX, N. J.; UYEKI, T. M. Public health implications of avian influenza viruses. In: SWAYNE, D. E. **Avian influenza**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 453-484.

DAOUST, P. Y.; KIBENGE, F. S. B.; FOUCHIER, R. A. M.; van de BILDT, M. W. G.; van RIEL, D.; KUIKEN, T. Replication of low pathogenic avian influenza virus in naturally infected mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) causes no morphologic lesions. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 2, p. 401-409, 2011.

DELOGU, M.; MARCO, M. A. de; TRANI, L. di; RAFFINI, E.; COTTI, C.; PUZELLI, S.; OSTANELLO, F.; WEBSTER, R. G.; CASSONE, A.; DONATELLI, I. Can preening contribute to influenza A virus infection in wild waterbirds? **PLOS One**, v. 5, n. 6, p. 1-9, 2010.

DOWNIE, J. C.; LAVER, W. G. Isolation of a type A influenza virus from an Australian pelagic bird. **Virology**, v. 61, p. 259-269, 1973.

DUSEK, R. J.; BORTNER, B.; DeLIBERTO, T. J.; HOSKINS, J.; FRANSON, J. C.; BALES, B. D.; YPARRAGUIRRE, D.; SWAFFORD, S. R.; IP, H. S. Surveillance for high pathogenicity avian influenza virus in wild birds in the Pacific flyway of the United States, 2006-2007. **Avian Diseases**, v. 53, n. 2, p. 222-230, 2009.

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.; PEIRIS, J. S. M. 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.

FACHINELLO, A. L.; FILHO, J. B. S. F. Análise dos reflexos econômicos derivados de surtos da gripe aviária no Brasil utilizando um modelo de equilíbrio geral computável. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ECONOMIA, ADMINISTRAÇÃO E SOCIOLOGIA RURAL, 46; 2008, Rio Branco. **Anais...** Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/9/412/.pdf>>. Acesso em: 09 fev. 2009.

FAIX, D. J.; SHERMAN, S. S.; WATERMAN, S. H. Rapid-test sensitivity for novel swine-

origin influenza A (H1N1) virus in humans. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, p. 728-729, 2009.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United States. **Wild birds and avian influenza: an introduction to applied field research and disease sampling techniques**. Rome: FAO, 2007. 115 p.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-91, 1985.

FEREIDOUNI, S. R.; WERNER, O.; STARICK, E.; BEER, M.; HARDER, T. C.; AGHAKHAN, M.; MODIRROUSTA, H.; AMINI, H.; MOGHADDAM, M. K.; BOZORGHMEHRIFARD, M. H.; AKHAVIZADEGAN, M. A.; GAIDET, N.; NEWMAN, S. H.; HAMMOUMI, S.; CATTOLI, G.; GLOBIG, A.; HOFFMANN, B.; SEHATI, M. E.; MASOODI, S.; DODMAN, T.; HAGEMEIJER, W.; MOUSAKHANI, S.; METTENLEITER, T. C. Avian influenza virus monitoring in wintering waterbirds in Iran, 2003-2007. **Virology Journal**, v. 7, n. 43, p. 1-14, 2010.

FERRO, P. J.; BUDKE, C. M.; PETERSON, M. J.; COX, D.; ROLTSCH, E.; MERENDINO, T.; NELSON, M.; LUPIANI, B. Multiyear surveillance for avian influenza virus in waterfowl from wintering grounds, Texas coast, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8., p. 1224-1230, 2010.

FOORD, A. J.; SELLECK, P.; COLLING, A.; KLIPPEL, J.; MIDDLETON, D.; HEINE, H. G. Real time RT-PCR for detection of equine influenza and evaluation using samples from horses infected with A/equine/Sydney/2007(H3N8). **Veterinary Microbiology**, v. 137, n. 1-2, p. 1-9, 2009.

FOUCHIER, R. A. M.; SCHNEEBERGER, P. M.; ROZENDAAL, F. W.; BROEKMAN, J. M.; KEMINK, S. A. G.; MUNSTER, V.; KUIKEN, T.; RIMMELZWAAN, G. F.; SCHUTTEN, M.; DOORNUN, G. J. J.; KOCH, G.; BOSMAN, A.; KOOPMANS, M.; OSTERHAUS, A. D. M. E. Avian influenza (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 5, p. 1356-1361, 2004.

FOUCHIER, R. A.; MUNSTER, V.; WALLENSTEN, A.; BESTEBROER, T. M.; HERFST, S.; SMITH, D.; RIMMELZWAAN, G. F.; OLSEN, B.; OSTERHAUS, A. D. Characterization of a novel influenza a virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **Journal of Virology**, v. 79, n. 5, p. 2814-2822, 2005.

FOUCHIER, R. A.; MUNSTER, V.; KEAWCHAROEN, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; KUIKEN, T. Virology of avian influenza in relation to wild birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. 7-14, 2007.

FREITAS, A. R. R.; FRANCISCO, P. M. S. B.; DONALISIO, M. R. Mortality associated with influenza in tropics, State of São Paulo, Brazil, from 2002 to 2011: the pre-pandemic, pandemic and post-pandemic periods. **Influenza Research and Treatment**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

FURNESS, R. W.; GREENWOOD, J. J.; JARVIS, P. J. Can birds be used to monitor the environment? In: FURNESS, R. W.; GREENWOOD, J. J. **Birds as monitors of environmental change**. UK: Oxford university press, 1994. p. 1-41.

GAIDET, N. DODMAN, T.; CARON, A.; BALANÇA, G.; DESVAUX, S.; GOUTARD, F.; CATTOLI, G.; LAMARQUE, F.; HAGEMEIJER, W.; MONICAT, F. Avian influenza viruses in water birds, Africa. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 626-629, 2007.

GAIDET, N.; MAMY, A. B. O. E.; CAPPELLE, J.; CARON, A.; CUMMING, G. S.; GROBOIS, V.; GIL, P.; HAMMOUMI, S.; ALMEIDA, R. S.; FEREIDOUNI, S.; CATTOLI, G.; ABOLNIK, C.; MUNDAVA, J.; FOFANA, B.; NDLOVU, M.; DIAWARA, Y.; HURTADO, R.; NEWMAN, S. H.; DODMAN, T.; BALANÇA, G. Investigating avian influenza infection hotspots in Old-World shorebirds. **PLOS One**, v. 7, n. 9, p. 1-12, 2012.

GARCÍA-SASTRE, A. The neuraminidase of bat influenza viruses is not a neuraminidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 46, p. 18635-18636, 2012.

GERDIL, C. The annual production cycle for influenza vaccine. **Vaccine**, v. 21, n. 16, p. 1776-1779, 2003.

GERLOFF, N. A.; JONES, J.; SIMPSON, N.; BALISH, A.; ELBADRY, M. A.; BAGHAT, V.; RUSEV, I.; MATTOS, C. C. de; ZONKLE, L. E. A.; KIS, Z.; DAVIS, C. T.; YINGST, S.; CORNELIUS, C.; SOLIMAN, A.; MOHAREB, E.; KLIMOV, A.; DONIS, R. O. A high diversity of Eurasian lineage Low Pathogenicity Avian Influenza A Viruses circulate among wild birds sampled in Egypt. **PLOS One**, v. 8, n. 7, p. 1-12, 2013.

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.

GILBERT, M.; JAMBAL, L.; KARESH, W. B.; FINE, A.; SHIILEGDAMBA, E.; DULAM,

P.; SODNOMDARJAA, R.; GANZORIG, K.; BATCHULUUN, D.; TSEVEENMYADAG, N.; BOLORTUYA, P.; CARDONA, C. J.; LEUNG, C. Y. H.; PEIRIS, J. S. M.; SPACKMAN, E.; SWAYNE, D. E.; JOLY, D. O. Highly pathogenic avian influenza virus among wild birds in Mongolia. **PLOS One**, v. 7, n. 9, p. 1-9, 2012.

GOEKJIAN, V. H.; SMITH, J. T.; HOWELL, D. L.; SENNE, D. A.; SWAYNE, D. E.; STALLKNECHT, D. E. Avian influenza viruses and avian paramyxoviruses in wintering and breeding waterfowl populations in North Carolina, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 1, p. 240-245, 2011.

GONZÁLEZ-REICHE, A. S.; MORALES-BETOULLE, M. E.; ALVAREZ, D.; BETOULLE, J. L.; MÜLLER, M. L.; SOSA, S. M.; PEREZ, D. R. Influenza A viruses from wild birds in Guatemala belong to the North American lineage. **PLOS One**, v. 7, n. 3, p. 1-11, 2012.

GROMS. Global Register of Migratory Species. **Databasing migratory species**, 2013. Disponível em: <<http://www.groms.de/groms/>>. Acesso em: 10 out. 2013.

HANSBRO, P. M.; WARNER, S.; TRACEY, J. P.; ARZEY, K. E.; SELLECK, P.; O'RILEY, K.; BECKETT, E. L.; BUNN, C.; KIRKLAND, P. D.; VIJAYKRISHNA, D.; OLSEN, B.; HURT, A. C. Surveillance and analysis of avian influenza viruses, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1896-1904, 2010.

HANSON, B. A.; STALLKNECHT, D. E.; SWAYNE, D. E.; LEWIS, L. A.; SENNE, D. A. Avian influenza viruses in Minnesota ducks during 1998-2000. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 867-871, 2003.

HANSON, B. A.; LUTTRELL, M. P.; GOEKJIAN, V. H.; NILES, L.; SWAYNE, D. E.; SENNE, D. A.; STALLKNECHT, D. E. Is the occurrence of avian influenza virus in Charadriiformes species and location dependent? **Journal of Wildlife Diseases**, v. 44, n. 2, p. 351-361, 2008.

HARRINGTON, B. A.; ANTAS, P. T. Z.; SILVA, F. Northward Shorebird Migration on the Atlantic Coast of southern Brazil. **Vida Silvestre Neotropical**, v. 1, n. 1, p. 45-54, 1986.

HAY, A. J. The virus genome and its replication. In: NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. **Textbook of influenza**. London: Blackwell Science, 1998. p. 43-53.

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. 243-253, 2012.

HILLEMAN, M. R. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. **Vaccine**, v. 20, n. 25-26, p. 3068-3087, 2002.

HINSHAW, V. S.; WEBSTER, R. G.; EASTERDAY, B. C.; BEAN JR, W. J. Replication of avian influenza A viruses in mammals. **Infection and Immunity**, v. 34, n. 2, p. 354-361, 1981.

HINSHAW, V. S.; WOOD, J. M.; WEBSTER, R. G.; DEIBEL, R.; TURNER, B. Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 4, p. 711-719, 1985.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 1, p. 129-149, 2001.

HOYE, B. J.; MUNSTER, V. J.; NISHIURA, H.; KLAASSEN, M.; FOUCHIER, R. A. M. Surveillance of wild birds for avian influenza virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 12, p. 1-18, 2010.

HURT, A. C.; HANSBRO, P. M.; SELLECK, P.; OLSEN, B.; MINTON, C.; HAMPSON, A. W.; BARR, I. G. Isolation of avian influenza viruses from two different transhemispheric migratory shorebirds species in Australia. **Archives of Virology**, v. 151, p. 2301-2309, 2006.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Family Orthomyxoviridae**, 2013. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 15 de out. 2013.

IP, H. S.; FLINT, P. L.; FRANSON, J. C.; DUSEK, R. J.; DERKSEN, D. V.; GILL Jr, R. E.; ELY, R. E.; ELY, C. R.; PEARCE, J. M.; LANCTOT, R. B.; MATSUOKA, S. M.; IRONS, D. B.; FISCHER, J. B.; OATES, R. M.; PETERSEN, M. R.; FONDELL, T. F.; ROCQUE, D. A.; PEDERSEN, J. C.; ROTHE, T. C. Prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds in Alaska: patterns of variation in detection at a crossroads of intercontinental flyways. **Virology Journal**, v. 5, n. 7, p. 1-10, 2008.

IP, H. S.; DUSEK, R. J.; HEYSEY, D. M. The effect of swab sample choice on the detection of avian influenza in apparently healthy wild ducks. **Avian Diseases**, v. 56, n. 1, p. 114-119, 2012.

ITO, T.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, T.; TAKADA, A.; HORIMOTO, T.; WELLS, K.; KIDA, H.; OTSUKI, K.; KISO, M.; ISHIDA, H.; KAWAOKA, Y. Recognition of N-glycolylneuraminic acid linked to galactose by the α -2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. **Journal of Virology**, v. 74, n. 9, p. 9300-9305, 2000.

ITZSTEIN, M. von. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 967-974, 2007.

JERNIGAN, D. B.; COX, N. J. Human influenza: one health, one world. In: WEBSTER, R. G.; MONTO, A. S.; BRACIALE, T. J.; LAMB, R. A. **Textbook of influenza**. Chichester: Wiley Blackwell, 2013. p. 3-19.

KATZ, J. M. The impact of avian influenza viruses on public health. **Avian Diseases**, v. 47, n. 3, p. 914-920, 2003.

KATZ, J. M. The public health impact of avian influenza viruses. **Poultry Sciences**, v. 88, p. 872-879, 2009.

KAWAOKA, Y.; CHAMBERS, T. M.; SLADEN, W. L.; WEBSTER, R. G. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? **Virology**, v. 163, p. 247-250, 1988.

KIM, H. R.; LEE, Y. J.; PARK, C. K.; OEN, 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. 480-483, 2012.

KOENIG, M.; KOSHA, S.; HICKMAN, M.; HEATH, D.; RIDDELL, S.; ALDOUS, W. Detection of influenza virus from throat and pharyngeal swabs with a nested duplex light cycler RT-PCR. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 46, n. 1, p. 35-37, 2003.

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

KRAUSS, S.; OBERT, C. A.; FRANKS, J.; WALKER, D.; JONES, K.; SEILER, P.; NILES, L.; PRYOR, S. P.; OBENAUER, J. C.; NAEVE, C. W.; WIDJAJA, L.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. Influenza of migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. **PLOS Pathogens**, v. 3, n. 11, p. 1684-1693, 2007.

- KRAUSS, S.; STALLKNECHT, D. E.; NEGOVETICH, N. J.; NILES, L. J.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. Coincident ruddy turnstone migration and horseshoe crab spawning an ecological 'hot spot' for influenza viruses. **Proceedings of the Royal B Society**, v. 277, p. 3373-3379, 2010.
- KUIKEN, T.; RIMMELZWAAN, G.; RIEL, D. van; AMERONGEN, G. van; BAARS, M.; FOUCHIER, R.; OSTERHAUS, A. Avian H5N1 influenza in cats. **Science**, v. 306, n. 5694, p. 241-250, 2004.
- LARA-RESENDE, S. M. Recuperação de anilhas estrangeiras no Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, p. 231-237, 1983.
- LEU, M.; THOMPSON, C. W. The potential importance of migratory stopover sites as flight feather molt staging areas: a review for Neotropical migrants. **Biological Conservation**, v.106, p. 45-56, 2002.
- LEWIS, N. S.; JAVAKHISHVILI, Z.; RUSSELL, C. A.; MACHABLISHVILI, A.; LEXMOND, P.; VERHAGEN, J. H.; VUONG, O.; ONASHVILI, T.; DONDUASHVILI, M.; SMITH, D. J.; FOUCHIER, R. A. M. Avian influenza virus surveillance in wild birds in Georgia: 2009-2011. **PLOS One**, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2013.
- LI, Q.; SUN, X.; LI, Z.; LIU, Y.; VAVRICKA, C. J.; GAO, G. F. Structural and functional characterization of neuraminidase-like N10 derived from bat influenza A virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 46, p. 18897-18902, 2012.
- LIU, J.; XIAO, H.; LEI, F.; ZHU, Q.; QIN, K.; ZHANG, X. W.; ZHANG, X. L.; ZHAO, D.; WANG, G.; FENG, Y.; MA, J.; LIU, W.; WANG, J.; GAO, G. F. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. **Science**, v. 309, p. 1206, 2005.
- MAXTED, A. M.; LUTTRELL, M. P.; GOEKJIAN, V. H.; BROWN, J. D.; NILES, L. J.; DEY, A. D.; KALASZ, K. S.; SWAYNE, D. E.; STALLKNECHT, D. E. Avian influenza virus infection dynamics in shorebirds hosts. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 2, p. 322-334, 2012.
- MINTON, C.; GOSBELL, K.; JOHNS, P.; CHRISTIE, M.; KLAASSEN, M.; HASSELL, C.; BOYLE, A.; JESSOP, R.; FOX, J. Geolocator studies on ruddy turnstone *Arenaria interpres* and greater sandplovers *Charadrius leschenaultii* in the East Asian-Australasia flyway reveal widely different migration strategies. **Wader Study Group Bulletin**, v. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

MOULD, J. A.; LI, H. C.; DUDLAK, C. S.; LEAR, J. D.; PEKOSZ, A.; LAMB, R. A.; PINTO, L. H. Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza A virus. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 12, p. 8592-8599, 2000.

MUNSTER, V. J.; BAAS, C.; LEXMOND, P.; WALDENTRÖM, J.; WALLESTEN, A.; FRANSSON, T.; RIMMELZWAAN, G. F.; BEYER, W. E.; 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. 630-638, 2007.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N., KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Virology**. Philadelphia: Raven Publishers, 1996. p. 1397-1445.

MYERS, J. P.; MORRISON, R. I. G.; ANTAS, P. T. Z.; HARRINGTON, B. A.; LOVEJOY, T. E.; SALLABERRY, M.; SENNER, S. E.; TARAK, T. E. Conservation strategy for migratory species. **American Scientist**, v. 75, p. 19-26, 1987.

MYERS, J. P.; SALLABERRY, M.; ORTIZ, E.; CASTRO, G.; GORDON, L. M.; MARON, J. L.; SCHICK, C. T.; TABILO, E.; ANTAS, P.; BELOW, T. Migration routes of New world sanderlings (*Calidris alba*). **The Auk**, v. 107, p. 172-180, 1990.

NAKAGAWA, Y.; ODA, K.; NAKADA, S. The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. **Journal of Virology**, v. 70, n. 9, p. 6390-6394, 1996.

NAKAJIMA, S.; NOBUSAWA, E.; NAKAJIMA, K. Variation in response among individuals to antigenic sites on the HA protein of human influenza virus may be responsible for the emergence of drift strains in the human population. **Virology**, v. 274, n. 1, p. 220-231, 2000.

NASCIMENTO, J. L. X.; LARRAZÁBAL, M. E. L. de. Alimentação de aves limícolas em Barra de Cunhaú, Canguaretama, Rio Grande do Norte. **Melopsittacus**, v. 3, n. 3, p. 91-109, 2000.

NEUMANN, G.; WATANABE, T.; KAWAOKA, Y. Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles. **Journal of Virology**, v. 74, n. 1, p. 547-551, 2000.

NEWTON, I. **The migration ecology of birds**. London: Elsevier, 2008. 984 p.

NICHOLSON, K. G. Human influenza. In: NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. **Textbook of influenza**. London: Blackwell Science, 1998. p. 219-264.

NILES, L. J.; BURGUER, J.; PORTER, R. R.; DEY, A. D.; MINTON, C. D. T.; GONZALEZ, P. M.; BAKER, A. J.; FOX, J. W.; GORDON, C. First results using light level geolocators to track red knots in the Western Hemisphere show rapid and long intercontinental flights and new details of migration pathways. **Wader Study Group Bulletin**, v. 117, n. 2, p. 123-130, 2010.

NUNES, M. F. C.; LACERDA, R.; ROOS, A.; COSTA, J. **Aves migratórias na Amazônia e a gripe aviária**, 2006. Disponível em: <<http://www.fmt.am.gov.br/imprensa/aves%20migratorias%20amazonia%20e%20gripe%20aviaria.pdf>>. Acesso em: 10 fev. 2009.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Facts and figures: avian influenza**, 2009a. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/web-portal-on-avian-influenza/about-ai/h5n1-notified-in-domestic-poultry-2003-2009/>>. Acesso em: 10 out. 2013.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Facts and figures: avian influenza**, 2009b. Disponível em: <<http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/web-portal-on-avian-influenza/about-ai/h5n1-notified-2003-2009/>>. Acesso em: 10 out. 2009.

OIE. World Organisation for Animal Health. **OIE-Listed diseases, infectious and infestations in force in 2013**, 2013. Disponível em: <<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2013/>>. Acesso em: 15 out. 2013.

OLSEN, B.; MUNSTER, V. J.; WALLENSTEN, A.; WALDENSTROM, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FOUCHIER, R. A. M. Global patterns of Influenza A virus in wild birds. **Science**, v. 312, p. 384-388, 2006.

O'NEILL, R. E.; TALON, J.; PALESE, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 1, p. 288-296, 1998.

PARMLEY, E. J.; SOOS, C.; BREAUULT, A.; FORTIN, M.; JENKINS, E.; KIBENG, F.; KING, R.; McALONEY, K.; PASICK, J.; PRYOR, S. P.; ROBINSON, J.; RODRIGUE, J.; LEIGHTON, F. A. Detection of low pathogenic avian influenza in wild ducks in Canada: comparison of two sampling methods. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 2, p. 466-470, 2011.

PEREDA, A. J.; UHART, M.; PEREZ, A. A.; ZACCAGNINI, M. E.; La SALA, 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.; SORREL, 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.

PHILIPPA, J. D. Avian Influenza. In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2008. p. 79-87.

PIERSMA, T. Using the power of comparison to explain habitat use and migration strategies of shorebirds worldwide. **Journal of Ornithology**, v. 148, p. 45-59, 2007.

POTTER, C. W. Chronicle of influenza pandemics. In: NICHOLSON, K.G., WEBSTER, R.F. AND HAY, A.J. **Textbook of influenza**. Oxford: Blackwell Science, 1998. p. 3-18.

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

PREGLIASCO, F.; MENSI, C.; CAMORALI, L.; ANSELM, G. Comparison of RT-PCR with other diagnostic assays for rapid detection of influenza viruses. **Journal of Medical Virology**, v. 56, p. 168-173, 1998.

PRESTI, R. M. ZHAO, G.; BEATTY, W. L.; MIHINDUKULASURIYA, K. A.; ROSA, A. P. A. T. da; POPOV, V. L.; TESH, R. B.; VIRGIN, H. W.; WANG, D. Quarant, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family *Orthomyxoviridae*. **Journal of Virology**, v. 83, n. 22, p. 11599-11606, 2009.

PYLE, G. F. **The diffusion of influenza: patterns and paradigms**. New Jersey: Rowman & Littlefield Publishers, 1986. 218 p.

RÁCZ, M. L. Ortomixovírus. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008a. p. 657-661.

RÁCZ, M. L. Diagnóstico laboratorial das infecções virais. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. São Paulo: Atheneu, 2008b. p. 581-592.

RAMBAUT, A. **FigTree**, 2007. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>>. Acesso em 20 out. 2013.

RAPPOLE, J. H. **Aves migratórias neárticas en los Neotrópicos**. New York: Smithsonian

Institution, 1993. 341p.

REICZIGEL, J.; FÖLDI, J.; ÓZSVÁRI, L. Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. **Epidemiology & Infection**, v. 138, p. 1674-1678, 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.

RODRIGUES, R. C.; AZEVEDO-JÚNIOR, S. M.; LARRAZÁBAL, M. E. L.; ARAUJO, H. F. P. Temporal variations of body mass and plumage in *Arenaria interpres* (Aves: Scolopaciidae) along the Brazilian coast. **Zoologia**, v. 26, n. 3, p. 386-390, 2009.

SALOMON, R.; WEBSTER, R. G. The influenza virus enigma. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 402-410, 2009.

SAMBIEDA, J. L.; JOHNSON, C. K.; CARDONA, C.; ANCHELL, N.; DAO, N.; REISEN, W.; BOYCE, W. Influenza A viruses in wild birds of the Pacific flyway, 2005-2008. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, p. 1-8, 2010.

SCHULZ-NETO, A.; SERRANO, I. L.; EFE, M. A. Muda e parâmetros biométricos de aves migratórias no norte do Brasil. **Ornithologia**, v. 3, n. 1, p. 21-33, 2008.

SENNE, D. A. Avian influenza in North and South America, 2002-2005. **Avian Diseases**, v. 51, p. 167-173, 2007.

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

SICK, H. **Migrações de aves na América do Sul continental**. Brasília: CEMAVE, 1983. 86 p.

SICK, H. **Ornitologia brasileira**. Rio de Janeiro: Nova Fronteira, 2001. 912 p.

SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Influenza haemagglutinin. **Vaccine**, v. 20, n. 2, p. S51-S54, 2002.

SLEMONS, R. D.; SHIELDCASTLE, M. C.; HEYMAN, L. D.; BEDNARIK, K. E.; SENNE, D. A. Type A influenza viruses in waterfowl in Ohio and implications for domestic turkeys. **Avian Diseases**, v. 35, n. 1, p. 165-173, 1991.

SMITH, W.; ANDREWES, C. H.; LAIDLAW, P. P. A virus obtained from influenza patients. **The Lancet**, v. 222, n. 5732, p. 66-68, 1933.

SMITH, G. J.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; LYCETT, S. J.; WOROBEY, M.; PYBUS, O. G.; MA, S. K.; CHEUNG, C. L.; RAGHWANI, J.; BHATT, S.; PEIRIS, J. S.; GUAN, Y.; RAMBAUT, A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, v. 459, n. 7250, p. 1122-1125, 2009.

SOARES, P. B.; DEMÉTRIO, C.; SANFILIPPO, L.; KAWAMOTO, A. H.; BRENTANO, L.; DURIGON, E. L. Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. **Journal of Virological Methods**, v. 123, n. 2, p. 125-130, 2005.

SOLIMAN, A.; SAAD, M.; ELASSAL, E.; AMIR, E.; PLATHONOFF, C.; BAHGAT, V.; EL-BADRY, M.; AHMED, L. S.; FOUDA, M.; GAMALELDIN, M.; MOHAMED, N. A. E.; SALYER, S.; CORNELIUS, C.; BARTHEL, R. Surveillance of avian influenza viruses in migratory birds in Egypt, 2003-2009. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 3, p. 669-675, 2012.

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 virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3256-3260, 2002.

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 birds lineages, and is adapted to domestic turkey. **Journal of Virology**, v. 80, n. 15, p. 7760-7764, 2006.

SPACKMAN, E.; McCracken, K. G.; WINKER, K.; SWAYNE, D. E. An avian influenza virus from waterfowl in South America contains genes from North American avian and equine lineages. **Avian Diseases**, v. 51, p. 273-274, 2007.

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

SPACKMAN, E.; SWAYNE, D. E.; GILBERT, M.; JOLY, D. O.; KARESH, W. B.; SUAREZ, D. L.; SODNOMDARJAA, R.; DULAM, P.; CARDONA, C. Characterization of low pathogenicity avian influenza viruses isolated from wild birds in Mongolia 2005 through 2007. **Virology Journal**, v. 6, n. 190, p. 1-8, 2009.

STALLKNECHT, D. E.; SHANE, S. M. Host range of avian influenza in free living birds. **Veterinary Research Communications**, v. 12, p. 125-141, 1988.

STALLKNECHT, D. E.; KEARNEY, M. T.; SHANE, S. M.; ZWANK, P. J. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza in water. **Avian Diseases**, v. 34, p. 412-418, 1990a.

STALLKNECHT, D. E.; SHANE, S. M.; ZWANK, P. J.; SENNE, D. A.; KEARNEY, M. T. Avian influenza viruses from migratory and resident ducks of coastal Louisiana. **Avian Diseases**, v. 34, n. 2, p. 398-405, 1990b.

STALLKNECHT, D. E.; BROWN, J. D. Wild birds and the epidemiology of avian influenza. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. S15-S20, 2007.

STALLKNECHT, D. E.; BROWN, J. D. Ecology of avian influenza in wild birds. In: SWAYNE, D. E. **Avian influenza**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 43-58.

STALLKNECHT, D. E.; GOEKJIAN, V. H.; WILCOX, B. R.; POULSON, R. L.; BROWN, J. D. Avian influenza in aquatic habitats: what do we need to learn? **Avian Diseases**, v. 54, n. 1, p. 461-465, 2010.

STALLKNECHT, D. E.; LUTTRELL, M. P.; POULSON, R.; GOEKJIAN, V.; NILES, L.; DEY, A.; KRAUSS, S.; WEBSTER, R. G. Detection of avian influenza viruses from shorebirds: evaluation of surveillance and testing approaches. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 48, n. 2, p. 382-392, 2012.

STANISLAWEK, W. L.; WILKS, C. R.; MEERS, J.; HORNER, G. W.; ALEXANDER, D. J.; MANVELL, R. J.; KATTENBELT, J. A.; GOULD, A. R. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallards ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. **Archives of Virology**, v. 147, p. 1287-1302, 2002.

STEININGER, C.; KUNDI, M.; ABERLE, S. W.; ABERLE, J. H.; POPOW-KRAUPP, T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2051-2056, 2002.

STURM-RAMIREZ, K. M.; HULSE-POST, D. J.; GOVORKOVA, E. A.; HUMBERD, J.; SEILER, P.; PUTHAVATHANA, P.; BURANATHAI, C.; NGUYEN, T. D.; CHAISINGH, A.; LONG, H. T.; NAIPOSPOS, T. S. P.; CHEN, H.; ELLIS, T. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M.; WEBSTER, R. G. Are ducks contributing to the endemicity of highly pathogenic H5N1 influenza virus in Asia? **Journal of Virology**, v. 79, n. 17, p. 11269-11279, 2005.

SUAREZ, D. L. Influenza A Virus. In: SWAYNE, D. E. **Avian influenza**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. p. 3-22.

SUN, X.; SHI, Y.; LU, X.; HE, J.; GAO, F.; YAN, J.; QI, J.; GAO, G. F. Bat-derived influenza hemagglutinin H17 does not canonical avian or human receptors and most likely uses a unique entry mechanism. **Cell Reports**, v. 3, n. 3, p. 769-778, 2013.

SÜSS, J.; SCHÄFER, J.; SINNECKER, H.; WEBSTER, R. G. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. **Archives of Virology**, v. 153, p. 101-114, 1994.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos-RN para detecção do vírus da febre do Nilo ocidental e outros vírus**, 2004. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_eletronico_epi_ano04_n02.pdf>. Acesso em: 14 out. 2013.

SVS. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Situação epidemiológica da Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 no Mundo e no Brasil, até a Semana Epidemiológica 47 de 2009**, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_se_47.pdf>. Acesso em: 20 set. 2011.

SWAYNE, D. E. The global nature of avian influenza. In: _____. **Avian influenza**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008a. p. 123-144.

SWAYNE, D. E. High pathogenicity avian influenza in the Americas. In: _____. **Avian influenza**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008b. p. 191-216.

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

TAKAKUWA, H.; YAMASHIRO, T.; LE, M. Q.; PHUONG, L. S.; OZAKI, H.; TSUNEKUNI, R.; USUI, T.; ITO, H.; YAMAGUCHI, T.; ITO, T.; MURASE, T.; ONO, E.; OTSUKI, K. The characterization of low pathogenic avian influenza viruses isolated from wild birds in northern Vietnam from 2006-2009. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, p. 581-590, 2013.

TAKEKAWA, J. Y.; IVERSON, S. A.; SCHULTZ, A. K.; HILL, N. J.; CARDONA, C. J.; BOYCE, W. M.; DUDLEY, J. P. Field detection of avian influenza virus in wild birds: evaluation of a portable rRT-PCR system and freeze-dried reagents. **Journal of Virological Methods**, v. 166, p. 92-97, 2010.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution** v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TAUBENBERGER, J. K.; REID, A. H.; KRAFFT, A. E.; BIJWAARD, K. E.; FANNING, T. G. Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. **Science**, v. 275, p. 1793-1796, 1997.

TAUBENBERGER, J. K.; REID, A. H.; JANCZEWSKI, T. A.; FANNING, T. G. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London / Series B, Biological Sciences**, v. 356, n. 1416, p. 1829-1839, 2001.

TERREGINO, C.; CAPUA, I. Conventional diagnosis of avian influenza. In: CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. **Avian influenza and Newcastle disease**. Milan: Springer, 2009. p. 73-86.

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 of the United States of America**, v. 109, n. 11, p. 4269-4274, 2012.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

VALDEZ, A. R. Pandemia de gripe Sinaloa, 1918-1919. **Elementos: Ciencia y Cultura**, v. 9, n. 47, p. 37-43, 2002.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; DA SILVA, L. C. **Características da Carne de Frango**, 2007. Disponível em: <http://www.agais.com/telomc/b01307_caracteristicas_carnefrango.pdf>. Acesso em 15 dez. 2008.

- VOOREN, C. M.; BRUSQUE, L. F. **As aves do ambiente costeiro do Brasil: biodiversidade e conservação**, 1999. Disponível em: <<http://www.vivamarajo.org.br/files/biotico/As-aves-do-ambiente-costeiro-do-Brasil-biodiversidade-e-cons.pdf>>. Acesso em: 7 nov. 2011.
- WALLENSTEN, A.; MUNSTER, V. J.; LATORRE-MARGALEF, N.; BRYTTING, M. ELMBERG, J.; FOUCHIER, R. A. M.; FRANSSON, T.; HAEMIG, P. D.; KARLSSON, M.; LUNDKVIST, A.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; STERVANDER, M.; WALDENSTRÖM, J.; OLSEN, B. Surveillance of Influenza A virus in migratory waterfowl in Northern Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 404-411, 2007.
- WARD, M. P.; MAFTEI, D. N.; APOSTU, C. L.; SURU, A. R. Association between outbreaks of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 and migratory waterfowl (family Anatidae) populations. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, p. 1-9, 2009.
- WARNOCK, N.; ELPHICK, C.; RUBEGA, M. A. Shorebirds in the marine environment. In: SCHREIBER, E. A.; BURGER, J. **Biology of marine birds**. Washington: CRC Press, 2001. p. 581-615.
- WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Are we ready for pandemic influenza? **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1519-1522, 2003.
- WEBSTER, R. G. Influenza: an emerging disease. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 3, p. 436-441, 1998.
- WEBSTER, R. G.; YAKHNO, M.; HINSHAW, V. S.; BEAN, W. J.; MURTI, K. G. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. **Virology**, v. 84, p. 268-278, 1978.
- WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBERS, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992.
- WEBSTER, R. G.; SHORTRIDGE, K. F.; KAWAOKA, Y. Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 275-279, 1997.
- WEBSTER, R. G.; KRAUSS, S.; HULSE-POST, D.; STURM-RAMIREZ, K. Evolution of influenza A viruses in wild birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 43, n. 3, p. S1-S6, 2007.

WERNER, O.; HARDER, T. C. Avian influenza. In: KAMPS, B. S.; HOFFMANN, C.; PREISER, W. **Influenza report**. Wuppertal: Flying Publisher, 2006. p. 48-86.

WHO. World Health Organization. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 58, n. 4, p. 585-591, 1980.

WHO. World Health Organization. **Influenza A (H5N1) in Hong Kong special administrative region of China**, 2003a. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/don/2003_02_27a/en/>. Acesso em: 06 nov. 2008.

WHO. World Health Organization. **Avian influenza in the Netherlands**, 2003b. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/don/2003_04_24/en/>. Acesso em: 06 nov. 2008.

WHO. World Health Organization. **Estimating the impact of the next influenza pandemic: enhancing preparedness**, 2004. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/disease/influenza/preparedness_2004_12_08/en/print.html> em 19 jan. 2005.

WHO. World Health Organization. **Pandemic (H1N1) 2009 – update 112**, 2010a. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/don/2010_08_06/en/index.html>. Acesso em: 22 out. 2013.

WHO. World Health Organization. **Influenza updates**, 2010b. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/don/2010_09_10/en/index.html>. Acesso em: 17 out. 2013.

WHO. World Health Organization. **Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza**. Geneva: WHO Press, 2011. 139 p.

WHO. World Health Organization. **Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2013**, 2013a. Disponível em: <http://www.WHO.int/influenza/human_animal_interface/EN_GIP_20131008CumulativeNumberH5N1cases.pdf>. Acesso em: 22 out. 2013.

WHO. World Health Organization. **Human infection with avian influenza A (H7N9) virus - update**, 2013b. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/don/2013_10_16/en/index.html>. Acesso em: 22 out. 2013.

YEWDELL, J.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza virus still surprises. **Current opinion in Microbiology**, v. 5, p. 414-418, 2002.

ZAMBON, M. C. Epidemiology and pathogenesis of influenza. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, p. 3-9, 1999.

ZOWALATY, M. E. el; ABIN, M.; CHANDER, Y.; REDIG, P. T.; GOYAL, S. M. Improved method for the isolation and sub-typing of avian influenza viruses from oropharyngeal samples of ducks. **Avian Diseases**, v. 55, n. 3, p. 439-442, 2011.