Luiz Francisco Sanfilippo

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
VÍRUS DA INFLUENZA EM QUATRO ESPÉCIES DE
PINGUINS NA REGIÃO ANTÁRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2010

LUIZ FRANCISCO SANFILIPPO

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
VÍRUS DA INFLUENZA EM QUATRO ESPÉCIES DE
PINGUINS NA REGIÃO ANTÁRTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Microbiologia no Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do Título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Walderez Gambale

São Paulo
2010

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Sanfilippo, Luiz Francisco.

Epidemiologia e caracterização molecular do vírus da influenza em
quatro espécies de pinguins na região antártica / Luiz Francisco
Sanfilippo.- São Paulo, 2010.

Orientador: Walderez Gambale.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração:
Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia.

Versão do título para o inglês: Epidemiology and molecular
characterization of the influenza virus in four penguin species of the
antartic region.

Descritores: 1. Influenza aviária 2. Vigilância epidemiológica 3.
Caracterização molecular 4. Virologia molecular 5. Antártica 6.
Pinguim I. Gambale Walderez II. Universidade de São Paulo. Instituto
de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.
III. Título

ICB/SBIB0159/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luiz Francisco Sanfilippo

Título da Tese: Epidemiologia e caracterização molecular do vírus da influenza em quatro espécies de pinguins da região antártica.

Orientador(a): Dr. Walderez Gambale

.A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:.....
Instituição:

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Virologia Clínica e Molecular

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900 - São Paulo - SP Brasil
Tel: (011) 3091-7293
Fax: (011) 3091-7354

São Paulo, 15 de Março de 2010

Ilmo. Sr
Prof Dr. José Cipolla Neto
Presidente da Comissão de Pós-Graduação ICB/USP

Eu, LUIZ FRANCISCO SANFILIPPO, nº USP 1143102, aluno regularmente matriculado do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas, nível **DOUTORADO**, venho por meio desta solicitar, para efeitos de exame geral de qualificação e de defesa de Tese, a equivalência das licenças 201/2006 da CGFAU/IBAMA com certificado concedido pela Comissão de Ética em Pesquisas com Animais número CEP 122/04 para o projeto intitulado **"SOROEPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VIRUS DA FEBRE DO OESTE DO NILO "WEST NILE FEVER VIRUS" NAS REGIÕES TROPICAL E SUB-TROPICAL DO BRASIL"**, e licenças do Programa Antártico Brasileiro – PROANTAR do período de 14/11/2006 a 08/03/2007 para o projeto em execução **"EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA**

Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Virologia Clínica e Molecular

Av. Prof. Lineu Prestes, 1374
05508-900 - São Paulo - SP Brasil
Tel: (011) 3091-7293
Fax: (011) 3091-7354

INFLUENZA EM QUATRO ESPÉCIES DE PINGUINS NA REGIÃO ANTÁRTICA",

em virtude da mudança do local de coleta das amostras e do objetivo previamente definido para a referida tese.

Outrossim ressaltamos que a metodologia utilizada para a coleta do material permaneceu a mesma, com coleta de sangue, swab oral e cloacal e que não houve sacrifício dos animais. As licenças pertinentes à coleta do material a ser estudado encontram-se anexas a este ofício.

Atenciosamente,

Luiz Francisco Sanfilippo
Nº USP 1143102
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. JOSÉ CIPOLLA NETO
Presidente da Comissão de Pós-Graduação
Instituto de Ciências Biomédicas
CPG/ICB/USP

*Arquivado ad referendum
da CPG*

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail:

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **122** nas fls. **10** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Soroepidemiologia e caracterização molecular do vírus da febre do Oeste do Nilo "West Nile Fever Vírus" nas regiões tropical e subtropical do Brasil**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Luiz Francisco Sanfilippo** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **23.11.2004**.

São Paulo, 24 de novembro de 2004.

Profa. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

PROGRAMA ANTÁRTICO BRASILEIRO - PROANTAR

LICENÇA

Em conformidade com o Art.3 do Anexo II ao Protocolo do Tratado da Antártica sobre Proteção ao Meio Ambiente e com as Medidas para Conservação da Fauna e Flora Antárticas adotadas pela ATCM, esta LICENÇA autoriza os pesquisadores do projeto *Microbiologia Antártica: Biodiversidade, Ecologia e Aplicações Tecnológicas*, listados abaixo, a proceder a captura e coleta de material biológico de aves antárticas: *Pingüins Gentoo* (*Pygoscelis papua*), *Adelie* (*Pygoscelis adeliae*) e *Antártico* (*Pygoscelis antarctica*); *Skua* (*Chataracta* sp); e *Gaivotões* (*Larus dominicanus*). Os pesquisadores também estão autorizados a coletar animais (aves e mamíferos marinhos) que venham a ser encontrados mortos por causas naturais, para a detecção de vírus de importância zoonótica.

VIVIAN HELENA PELLIZARI
CRISTINA ROSSI NAKAYAMA
JANSEN DE ARAÚJO
LEANDRO HELGUEIRA DE ANDRADE
LUIZ FRANCISCO SANFILIPPO
RUBENS DUARTE
LIA CARDOSO R. SARAIVA TEIXEIRA
LUIZ HENRIQUE ROSA
MÁRIO LUIS FIGUEIREDO
ROSALINDA CARMELA MONTONE

RUBENS CÉSAR LOPES FIGUEIRA
ALEXANDRE SOARES ROSADO
ANDRÉS OCHOA
CÉSAR DE CASTRO MARTINS
RAFAEL ANDRÉ LOURENÇO
WILLIAM JOSÉ FERREIRA
LUIS RENATO DE SOUZA
GERALDO JOSÉ SANZANEZI
JULIANA NODA BECHARA BELO
MARCELO KRINGS

Local: Baía do Almirantado, Ilha Rei George
Período: 14/NOV/2006 a 08/MAR/2007

Brasília – DF, 19 de outubro de 2006.

Contra-Almirante JOSÉ EDUARDO BORGES DE SOUZA
Administrador do PROANTAR - SECIRM

VIVIAN HELENA PELLIZARI
Coordenadora de Projeto de Pesquisa

TÂNIA APARECIDA SILVA BRITO
Coordenadora do Grupo de Avaliação Ambiental – MMA

O solicitante declara ser responsável por todas as informações prestadas neste formulário. Declara também conhecer os termos do Plano de Gerenciamento da Área Antártica Especialmente Protegida, assim como está ciente da exigência de portar uma cópia da presente Licença, enquanto permanecer no interior da Área, e de apresentar um Relatório de Visita no término da mesma, de acordo com o Protocolo ao Tratado da Antártida sobre Proteção do Meio Ambiente, internalizado na legislação nacional pelo Decreto Legislativo Nº 88/1995.

Data: São Paulo, 29 de setembro de 2006.

Dra. Vivian Helena Pellizari
Responsável pelo Projeto de Pesquisa

Autorização:

Dra Tânia Aparecida Silva Brito
Coordenadora
Grupo de Avaliação Ambiental do PROANTAR - GAAM/MMA

Contra-Almirante José Eduardo Borges de Souza
Administrador do PROANTAR

**Área Antártica Especialmente Protegida
LICENÇA PARA VISITAÇÃO**

13. Comentários ou informações adicionais, se necessárias:

1. Para o preenchimento do presente formulário foram consultados os seguintes documentos:

- Scar Code of Conduct for the use of animals for scientific purposes in Antarctica
- Protocol on Environmental Protection to the Antarctic Treaty (1991) – anexo 2, artigo 3 (“Protection of native fauna and flora”).
- Management Plan for Site of Special Scientific Interest Number 8

2. O especialista em aves que compõe a equipe é o pesquisador Luiz Francisco Sanfilippo, que possui extensa experiência na área, tendo trabalhado em diversos ecossistemas no Brasil e no exterior, incluindo pingüineiras.

O solicitante declara ser responsável por todas as informações prestadas neste formulário. Declara também conhecer os termos do Plano de Gerenciamento da Área Antártica Especialmente Protegida, assim como está ciente da exigência de portar uma cópia da presente Licença, enquanto permanecer no interior da Área, e de apresentar um Relatório de Visita no término da mesma, de acordo com o Protocolo ao Tratado da Antártida sobre Proteção do Meio Ambiente, internalizado na legislação nacional pelo Decreto Legislativo Nº 88/1995.

O solicitante está autorizado a coletar animais mortos (aves e mamíferos marinhos) para amostragem de tecidos e a visitar as áreas de nidificação das aves para procurar e coletar ovos gorados, bem como filhotes mortos, desde que seja acompanhado por especialistas da área e desde que todo cuidado seja tomado para não perturbar os animais das colônias visitadas.

Data: São Paulo, 29 de setembro de 2006.

Dra. Vivian Helena Pellizari
Responsável pelo Projeto de Pesquisa

Autorização:

Dra Tânia Aparecida Silva Brito
Coordenadora do GAAM/MMA

Contra-Almirante José Eduardo Borges de Souza
Administrador do PROANTAR

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS (DIFAP)
COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA (CGFAU)
LICENÇA PARA CAPTURA/COLETA /TRANSPORTE

NÚMERO DA LICENÇA 201/2006 - CGFAU	Nº DE REGISTRO NO IBAMA	PERÍODO DE VALIDADE 18/10/2006 a 18/10/2007	PROCESSO IBAMA 02027.002839/2005
OBJETO:		FAVORECIDO:	
☒ CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO		☐ ZOOLOGICO	
☒ TRANSPORTE DE MATERIAL ZOOLOGICO		☒ INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA	
☐ COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)		☒ PESQUISADOR	
☐ TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA		☐ EXPOSITOR/CONCURSO	
☐ EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES		☐ CRIADOURO COMERCIAL	
☐ MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO		☐ CRIADOURO CIENTÍFICO	
☐ OUTROS:		☐ OUTROS:	

FAVORECIDOS

NOME(S): Edison Luiz Durigon, Luiz Francisco Sanfilippo, Miguel Augusto Golono, Jansen de Araújo, Felipe Alves, Moraes e Carolina de Souza Ferreira.

INSTITUIÇÃO: Universidade de São Paulo, Instituição de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia.

ENDEREÇO: Av. Prof. Lineu Prestes, 1374 - Prédio ICB II, São Paulo, SP, 05508-900

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO: Edison Luiz Durigon.

TRANSPORTADOR: Pesquisadores favorecidos.

MEIO DE TRANSPORTE: Terrestre / Aéreo / Fluvial.

PROCEDÊNCIA/LOCAL DA CAPTURA/LOCAL DA PESQUISA: Estado de São Paulo e Rondônia

DESTINO DO MATERIAL: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia.

LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
Captura, marcação e coleta / Nº Indeterminado	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Ac. albopictus</i> , <i>Ae. scapularis</i> , <i>Ae. serratus</i> , <i>Culex quinquefasciatus</i> , <i>Cx. nigripalpus</i> , <i>Cx. melanoconion</i> , <i>Cocquilettidia venezuelensis</i> , <i>Mansonella sp.</i> , <i>Psorophora ferox</i>	Artrópodes
Captura seguida de soltura para marcação e coleta de dados biométricos, sangue e fezes / Nº Indeterminado	Rodentia, Marsupialia e Quiroptera	Roedores, marsupiais e morcegos
Captura seguida de soltura para coleta de dados biométricos, sangue, fezes e secreção oral e cloacal / Nº Indeterminado	Avifauna	Aves

OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES:

1. A autorização de anilhamento deverá ser solicitada pelo anilhador sênior, membro da expedição, ao Centro Nacional de Pesquisa para Conservação das Aves Silvestres (CEMAVE) através do Sistema Nacional de Anilhamento SNA.net <http://www.ibama.gov.br/cemave>
2. O responsável pela expedição deverá apresentar relatório de atividades ao término da validade desta licença.
3. O responsável pela expedição deverá encaminhar ao IBAMA cópia dos frontispícios das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes objeto desta licença.
4. Esta licença não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01, Decreto nº 3.945/2001 e Decreto nº 4.946/2003 que dispõem sobre o acesso de componente do patrimônio genético.
5. Esta licença permite o transporte de amostras de Flavivirus, Alphavirus e Bunyavirus da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto e do Instituto Evandro Chagas, Fundação Nacional de Saúde, Belém, Pará para o Instituto de Ciências Biomédicas, USP.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO Brasília (DF), 18 de outubro de 2006.	AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO)
--	--

Aos meus pais Miguel e Therezinha, que sempre me incentivaram e apoiaram em todas as decisões e projetos da minha vida.

Aos meus irmãos Antônio, Maria e Lúcia por estarem sempre ao meu lado.

A minha querida futura esposa Celina por seu apoio constante em todos os momentos.

Ao meu avô Manoel por ter me guiado sempre pelos difíceis caminhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho, em especial,

Minha mãe Therezinha Domingos Sanfilippo meu pai Miguel Sanfilippo, meus irmãos Antônio, Maria e Lúcia, meus cunhados Claudio, Armin e Maria Helena, meus sobrinhos Rafael, Vinícius, Mariana e Gabriela que além da dedicatória têm minha eterna gratidão.

Aos meus grandes amigos Carlos Yamashita e Antonio Audi por terem sempre me guiado.

Ao prof. Edison L. Durigon que mais do que um orientador, se mostrou um grande amigo.

A todos os integrantes da equipe de campo do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP): Jansen de Araújo, Carolina Ferreira, Renata Hurtado, Tatiana Ometto, José Maria Lopes, Miguel Golono, Cristiane Demetrio, Mário Figueiredo, Luciano Thomazelli, Ricardo Lieutaud, e a equipe de suporte: Dani, Lílían e Juliana.

Aos amigos pesquisadores Silvana Favoretto, Adélia Kawamoto, Luiz Eloy Pereira pelo exemplo que sempre tentarei seguir.

A amiga Angélica Cristine de Almeida Campos, pela enorme força e paciência.

A Jacinta pelos vários puxões de orelha.

Aos meus amigos Emanuelle e Azis por sempre terem me ajudado.

Aos Ilmos. membros da minha banca examinadora de qualificação:

Todos os amigos do Laboratório de Virologia – USP: Andréa, Ariane, César, Claudionor, Danila, Eduardo, Maria Paula, Cláudia, Dyana, Fábio, Felipe, Gustavo, Hildener, Jean, Larissa, Lília, Patrícia, Thereza, Raquel, Vivian, Daniele, Camila, Raquel...

Ao meu orientador Prof. Dr. Walderez Ganbale, pelo apoio e amizade.

Ao amigo Joaquim O. Branco, pela ajuda durante as Expedições Antárticas.

À marinha do Brasil e o programa PROANTAR pelo suporte à Expedição Antártica.

À Gaia Consultoria pela compreensão.

Aos secretários da pós Graduação da USP, Alice e Bruno

Às funcionárias da Biblioteca do ICB, Monica e Eva.

Aos profissionais da secretaria de microbiologia pelo apoio em tudo.

E por fim, por tudo, à mulher da minha vida Celina Keiko Yoshihara.

“Procuram-se homens para perigosa viagem. Salário reduzido. Frio penetrante. Muitos meses de completo escuro. Constante perigo. Regresso são e salvo duvidoso. Honra e reconhecimento em caso de êxito”

Ernest Shackleton

RESUMO

Sanfilippo LF. Epidemiologia e caracterização molecular do vírus da influenza em quatro espécies de pinguins da região antártica [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

O vírus da influenza, apesar de todas as epidemias e pandemias referirem-se a infecções em seres humanos, não está restrito a espécie humana e é capaz de causar debilidade ou mortalidade em várias outras espécies, incluindo cavalos, suínos, mamíferos marinhos e aves, entre outros. Estudos ecológicos das viroses por influenza conduziram à hipótese que todas as que acometem mamíferos derivam de reservatórios destes vírus em aves. Mesmo com programas de monitoramento contínuo de aves silvestres em alguns países do mundo que possuem casos originados pelos vírus aviário H5N1, pouco foi feito na Antártica, e por isso, o presente trabalho foi realizado nas estações de verão antártico de 2006, 2007 e 2008 em duas localidades no território Antártico, a Península Keller, localizada na Ilha Rei George e na ilha Elefante 61°08'S, 55°07'W, a primeira onde está situada a Estação Antártica Comandante Ferraz-EACF e a segunda onde está localizada uma base de apoio a estudos avançados. Para este estudo foi realizada a coleta de 283 amostras de quatro diferentes espécies de pinguins: *Pygoscelis adeliae*; *P. papua*; *P. antarctica*; *Aptenodytes patagonicus*. Para o diagnóstico das amostras colhidas, foi aplicada a detecção direta dos produtos amplificados pelo método de RT-PCR em gel de agarose confirmados pelo método de Real-Time PCR (Applied Biosystems) e pelo RT-PCR-GeneScan no laboratório de Virologia Clínica e Molecular, do Departamento de Microbiologia, da Universidade de São Paulo. Os resultados obtidos em nosso estudo foram 8 amostras positivas em pinguins para o vírus Influenza A. As amostras positivas por RT-PCR, e as outras amostras coletadas, foram encaminhadas para o laboratório de Influenza do Department of Infectious Diseases, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA, para isolamento em ovos embrionados, não havendo crescimento de vírus da influenza A. Quatro destas amostras positivas puderam ser sequenciadas e comparadas com sequências de Influenza A depositadas no GenBank apresentando uma identidade de 96,8 % a 100 % entre elas e o controle tendo este último uma identidade de 100% com as do banco de dados, confirmando a presença do vírus nestas aves.

Palavras-chave: Influenza aviária. Vigilância Epidemiológica. Caracterização Molecular. Virologia Molecular. Antártica. Pinguim.

ABSTRACT

Sanfilippo LF. Epidemiology and molecular characterization of the influenza virus in four penguin species of the antarctic region. [Ph. D. thesis (Microbiology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo; 2010.

Epidemics and pandemics of influenza usually refer to infections in human beings. The influenza virus is not, however, restricted to humans and can cause infirmity and death in other species—including horses, swine, marine mammals, birds, and others. Ecological studies of viral infections have led to the hypothesis that the influenza viruses that attack mammals have their origin in the accumulation of these viruses in birds (avian flu). In some countries with influenza cases caused by the avian H5N1 virus, there was monitoring of wild birds but little had been done in Antarctica. The present work was therefore carried out during the Antarctic summer seasons of 2006, 2007, and 2008 in two Antarctic locations: The Commander Ferraz Antarctic Station, on the Keller Peninsula of King George Island, and at the Base of Advanced Studies located on Elephant Island (61°08'S, 55°07'W). Two hundred eighty-three (283) samples from four different penguin species—*Pygoscelis adeliae*, *Pygoscelis papua*, *Pygoscelis antarctica*; and *Aptenodytes patagonicus*—were collected for this study. Diagnoses of the samples were performed not only by application of direct detection and amplification according to the RT-PCR method in agar-gel, but also by Real-Time PCR (Applied Biosystems), and by RT-PCR gene scan at the Laboratory of Clinical and Molecular Virology of the Department of Microbiology of the University of Sao Paulo. Eight of the penguin samples tested positive for the Influenza-A virus. The positive samples, as determined by RT-PCR, and the others samples, were sent to the Influenza Laboratory of the Department of Infectious Diseases of the St. Jude Research Hospital in Memphis, Tennessee, USA, to be isolated in egg embryos—where no further growth of the Influenza-A virus took place. Four of these positive samples could be sequenced and compared with those of Influenza-A on deposit at the GenBank and ranged from 96.85 to 100%—when compared with the control samples (100% positive), thus confirming the presence of the virus in the tested birds.

Key words: Avian flu. Epidemiological. Surveillance. Molecular. Characterization. Molecular virology. Antarctic. Penguin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Micrografia eletrônica de transmissão do vírus de Influenza.	18
Figura 2- Mapa demonstrando a pandemia de influenza em 1918.....	19
Figura 3 - Modelo estrutural do vírus da influenza do tipo A.	21
Figura 4 – Ciclo de vida do vírus da Influenza.	23
Figura 5 – Reservatórios do vírus de influenza A.	27
Figura 6 - Principais rotas migratórias (“flyways”)	28
Figura 7 – Distribuição das espécies de pinguins no continente	30
Figura 8 - Estrutura colocada a disposição pelo Programa Antártico Brasileiro utilizada para a realização do trabalho.....	35
Figura 9 - Imagem de satélite mostrando a localização da Estação Brasileira Comandante Ferraz, na Ilha Rei George, ponta da grande Península Antártica.....	36
Figura 10 – Mapa da Ilha Rei George mostrando a localização da Estação Brasileira Comandante Ferraz e os pontos de coleta de material em Punta Plaza, Punta Heinnequin, Refúgio 1 e o Módulo de Química.	37
Figura 11 - Imagem de satélite mostrando a localização da Ilha Elefante	38
Figura 12 - Mapa da Ilha Elefante mostrando a localização do Refúgio para Estudos e o ponto de coleta de material.....	38
Figura 13 - Vista parcial da Ilha Elefante quando da chegada com o helicóptero.	39
Figura 14 – Captura de exemplar de pinguim, próximo ao módulo de química.	40
Figura 15 – Utilização de zaragatoa para coleta de material oral.....	41
Figura 16 – Retirada de sangue da artéria femoral.....	41
Figura 17 - Laboratório do módulo de química, Ilha Rei George.	42
Figura 18 - Barraca laboratório (vermelha e branca) próximo ao refúgio, Ilha Elefante.	42
Figura 19 - Pinguim marcado antes da soltura com tinta atóxica.....	43
Figura 20 - Sequência completa do gene NS do segmento 8.	45

Figura 21 - Sequência completa dos genes M1 e M2 contidos no segmento 7.....	46
Figura 22 - Ovos marcados e prontos para a inoculação.....	51
Figura 23 - A- Lixadeira portátil utilizada para fazer a abertura na casca dos ovos e permitir a entrada da agulha na cavidade alantóica. B- Inoculação de ovos embrionados com 2µL de amostra.	52
Figura 24 - Placas de Petri contendo ágar sangue para a execução dos testes de esterilidade dos cultivados.	53
Figura 25 – Pinguim-papua, <i>Pygoscelis papua</i>	55
Figura 26 – Pinguim-adélia, <i>Pygoscelis adeliae</i>	56
Figura 27 – Pinguim-antártico, <i>Pygoscelis antarctica</i>	56
Figura 28 – Pinguim- rei, <i>Aptenodytes patagonicus</i>	57
Figura 29 – Proporção entre as espécies de pinguins amostradas durante o verão Antártico de 2006/2007.	58
Figura 30 – Proporção entre as espécies de pinguins amostradas durante o verão Antártico de 2007/2008	59
Figura 31 – Proporção entre as espécies de pinguins amostradas durante o verão Antártico de 2008/2009.	60
Figura 32 – Proporção entre as espécies de pinguins amostradas nos três verões antárticos..	61
Figura 33 - Resultado positivo do RT - PCR com leitura em gel de agarose (amostra 16/06 de <i>Pygoscelis adeliae</i>).	64
Figura 34 - Resultado do PCR em Tempo Real da amostra 86/06, demonstrando em vermelho a curva de amplificação do controle positivo e em azul a curva de amplificação da amostra.	65
Figura 35 – Resultado do PCR GeneScan da amostra 16/06, demonstrando em vermelho a curva de amplificação do controle positivo e em azul a curva de amplificação da amostra. ...	66
Figura 36 - Comparação entre as sequências de nucleotídeos indicam uma similaridade entre as sequências obtidas e as do controle.....	67
Figura 37 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança (maximum likelihood),	68
Figura 38 - Resultados obtidos em uma das placas realizadas para o teste de hemaglutinação.	69
Figura 39 - Teste rápido para a amostra 35.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequencias obtidas no GeneBank do segmento 8 do vírus da influenza A utilizadas para comparação com as amostras positivas de pinguins.....	49
Tabela 2 - Número de pinguins amostrados por espécie no verão antártico de 2006/2007. ...	57
Tabela 3 - Número de pinguins amostrados por espécie no verão antártico de 2007/2008. ...	58
Tabela 4 - Número de pinguins amostrados por espécie no verão antártico de 2008/2009. ...	59
Tabela 5 - Número de pinguins amostrados por espécie nas três estações de verão antártico.	60
Tabela 6 - Amostras com resultado positivo testadas pelo método de PCR com visualização em gel de agarose	61
Tabela 7 - Tabela das 35 amostras que apresentaram bandas fracas e foram novamente testadas pelo método de PCR com visualização em gel de agarose.....	62
Tabela 8 - Matriz comparativa da identidade verificada entre as amostras positivas para influenza A e o controle positivo H1N1.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µl:	Microlitro
aC:	Antes de Cristo
cDNA:	DNA complementar
cm:	Centimetro
dC:	Depois de Cristo
	Deoxynucleoside triphosphates).
DEPC:	Dietilpirocarbonato
dNTP's:	Deoxiribonucleosídeos 5'- trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP)(do ingl.
EACF:	Estação Antártica Comandante Ferraz.
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético (do ingl. Ethylenediaminetetraacetic acid)
ELISA:	Ensaio imunoenzimático
FluA -:	Primer (5'cccattctcattactgcttc 3')
FluA+:	Primer (5'ctaagggtttcaccgaaga 3').
g:	Grama
Gs:	GeneScan
H:	Hemaglutinação
HA:	Hemaglutinina
HPAI:	Sigla em ingles para highly pathogenic avian influenza.
IFA:	Ensaio de imunofluorescência
INFA_F:	Primer (5'gac cra tcc tgt cac etc tga c 3')
INFA_R	Primer(5'agg gca tty tgg aca aak cgt cta 3')
km:	Kilometro
LPAI:	Sigla em ingles para low pathogenic avian influenza.
m:	metro
M1:	Proteína de membrana do vírus da Influenza
M2:	Proteína formadora de canais iônicos
MEM:	Meio mínimo essencial Eagle
min:	Minuto
ml:	Mililitro (10^{-3} litro)
mM:	Milimolar (10^{-3} molar)
NA:	Neuraminidase
NB2:	Laboratório de sequência nível 2.

NP:	Nucleoproteína
NS1:	Proteína viral com função não estrutural, mas sim tradutora e transportadora.
NS2:	Proteína viral com função desconhecida.
nt:	Nucleotídeos
pb:	Pares de bases
PB1:	Proteína viral transcriptase de alongamento, codificada pelo seguimento 2
PB2:	Proteína viral transcriptase de ligação, codificada pelo seguimento 1
PBS:	Solução salina tamponada com fosfatos
PCR:	Reação em cadeia pela polimerase
pH:	Potencial hidrogeniônico
pmoles:	Picomol (10^{-12} mol)
primer:	Oligonucleotídeo iniciador
q.s.p:	Quantidade suficiente para
RNA:	Ácido Ribonucléico
RNAc:	RNA complementar
RNAm:	RNA mensageiro
RNAse:	Ribonuclease
RNAv:	Ácido Ribonucléico viral
RNAv:	RNA viral
RT:	Transcrição reversa
RT-PCR:	Reação em cadeia pela polimerase após transcrição reversa
s:	Segundo
TAE:	Solução tampão com 40 mM Tris-acetato pH 8,0, 1 mM EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético
Tris:	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
U:	Unidade
URF:	Unidade Relativa de Fluorescência
USP:	Universidade de São Paulo
UV:	Ultravioleta
V:	Volts

LISTA DE SÍMBOLOS

Bases nitrogenadas dos nucleotídeos

Adenina.....	a
Citosina.....	c
Guanina.....	g
Timina.....	t

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	32
3 OBJETIVOS	34
4 MATERIAL E METODOS	35
4.1 Expedição para coleta de amostras	35
<i>4.1.1 Coleta de Amostras</i>	<i>39</i>
4.2 Extração de RNA das Amostras Virais	43
4.3 Transcrição Reversa.....	43
4.4 Reações de PCR para a Detecção Viral.....	44
4.5 Eletroforese em Gel de Agarose	45
4.6 PCR em Tempo Real	45
4.7 PCR GENESCAN (Gs)	47
<i>4.7.1 Detecção dos Produtos Amplificados</i>	<i>47</i>
4.8 Sequenciamento do Material Genético	48
<i>4.8.1 - Processamento e alinhamento das sequências obtidas com as do segmento 8 do vírus da influenza A</i>	<i>48</i>
<i>4.8.2 Análise Genealógica</i>	<i>50</i>
4.9 Inoculação em ovos embrionados.....	50
<i>4.9.1 Preparação dos Antibióticos.....</i>	<i>50</i>
<i>4.9.2 Preparação dos Ovos e Inoculação</i>	<i>51</i>
<i>4.9.3 Colheita do material incubado</i>	<i>52</i>
<i>4.9.4 Teste de esterilidade</i>	<i>52</i>
<i>4.9.5 Teste de Hemaglutinação</i>	<i>53</i>
<i>4.9.6 Teste rápido para detecção de influenza.....</i>	<i>54</i>
5 RESULTADOS	55
5.1 Amostras Coletadas.....	55
5.2 Detecção Viral Através da Reação de PCR.....	61
5.3 Detecção Viral Através do PCR em Tempo Real	64
5.4 Detecção Viral Através de Técnica de GeneScan	65

5.5 Sequenciamento	66
5.5.1 Análise genealógica	67
5.6 Inoculação em Ovos Embrionados.....	69
5.6.1 Teste de esterilidade	69
5.6.2 Teste de hemaglutinação	69
5.6.3 Teste rápido para detecção de influenza	70
6 DISCUSSÃO	71
7 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS*	80
APÊNDICE A - Tabela do resultado do total de amostras testadas pelo método de PCR com visualização em gel de agarose, PCR em Tempo Real, GeneScan e confirmadas por sequenciamento.....	86

1 INTRODUÇÃO

A gripe, uma doença respiratória aguda causada pelo vírus da influenza, foi disseminada pelas populações humanas há muitos séculos. É definida como uma doença de alta patogenicidade, particularmente atacando o sistema respiratório sendo transmitida pela inalação de perdigoto proveniente de organismos infectados, causando periódicas epidemias e pandemias (Kuszevski e Brydak, 2000).

A Influenza é considerada um paradigma das doenças virais, principalmente por possuir características que proporcionam uma continua evolução do vírus causador e primordialmente pela sua importância em gerar epidemias anuais - ocasionalmente pandemias – em animais e na população humana. (Webster et al., 1992)

Figura 1- Micrografia eletrônica de transmissão do vírus de Influenza.

FONTE: adaptado de Goldsby et al. (2000).

Data de 412 a.C. os primeiros registros de sua ocorrência que se tem conhecimento. Há relatos de epidemias em seres humanos ocorridas na Europa em 1414, 1557, 1675-1676, 1788-1790 e em 1830-1832. (Smith, 1995). No século XX, quatro pandemias acometeram o mundo em 1918, 1957, 1968 e 1977, sendo a de 1918 - denominada de gripe espanhola (H1N1) – considerada a pandemia mais grave que se tem notícia, matando mais de 40 milhões de pessoas em todo o planeta (Taubenberger et al., 2001).

Em 1933 o vírus foi identificado por Wilson Smith, Christopher Andrewes e Patrick Laidlow do National Institute for Medical Research em Londres após uma epidemia. Atualmente

este vírus é classificado como sendo do tipo A. Em 1940 e 1950, respectivamente foram descobertas a existência de um tipo B e C do vírus da Influenza (Hilleman, 2002). Dos tipos virais descritos, somente o tipo A pode acometer o homem e animais silvestres e domésticos. Os tipos B e C atacam somente o ser humano sendo o primeiro capaz de promover epidemias e o segundo apenas sintomas subclínicos.

Em 1957 um novo vírus da influenza apareceu no sudeste da China. Tratava-se de uma influenza do tipo A e subtipo H2N2 causando uma nova pandemia denominada “gripe asiática”. Neste período as cepas de H1N1 desapareceram completamente da população humana. No ano de 1968 uma nova pandemia apareceu na China, a chamada “gripe de Hong Kong”. O vírus responsável era do subtipo H3N2 (Cox e Subbarao, 2000).

Figura 2- Mapa demonstrando a pandemia de influenza em 1918. Primeiras manifestações (■) Março de 1918; linhas de propagação da primeira onda de infecção (---➔), linhas de propagação da segunda onda de infecção (—➔); pontos focais da segunda onda de infecção (●): Pandemia de 1957 (setas vermelhas), ponto de origem em fevereiro de 1957 (■) linhas de propagação da onda de infecção (➔).

FONTE : adaptado de Potter (2001).

A pandemia de 1977, denominada gripe Russa, foi marcada pelo reaparecimento do Subtipo H1N1 e o desaparecimento das cepas de H3N2 das populações humanas. Esta pandemia foi caracterizada pela capacidade do vírus da Influenza em infectar principalmente crianças e jovens, sendo as pessoas de mais de 50 anos pouco afetadas. Mais de 50% das crianças em idade escolar em todo o mundo foram infectadas, porém com baixas taxas de mortalidade (Laver e Garman, 2002; Cox e Subbarao, 2000).

Todos os vírus da influenza conhecidos pertencem à família Orthomyxoviridae, sendo que este táxon abriga 5 gêneros diferentes, 3 de influenza (*Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C*) além dos *Thogotovirus* (transmitidos por carrapatos ao homem não causando os sintomas de influenza) e *Isavirus* (responsáveis pela anemia infecciosa em salmão, sendo transmissão feita de peixe para peixe pela água). O vírus da influenza A, B e o Vírus causador da anemia infecciosa em salmões tem seu genoma composto por 8 segmentos de RNA de polaridade negativa (complementar ao RNA mensageiro). Os vírus da Influenza C e o Dori Vírus (um *Thogotovirus*) tem 7 segmentos enquanto o vírus Thogoto tem 6 segmentos de RNA (Büchem e Osmond, 2003; Calisher, 2009).

Cada segmento do RNAv está associado à nucleoproteína NP (Klumpp et al., 1997) e a um complexo de polimerase viral (Brown, 2000).

Os segmentos 1, 2 e 3 codificam respectivamente as proteínas PB2 (com função de transcriptase de ligação a qual inicia o processo de transcrição), PB1 (transcriptase com função de alongamento, responsável pelo processo de elongação RNA mensageiro viral) e PA, uma protease de atividade ainda incerta, mas que é necessária para a transcrição e replicação do RNAv. (Hay, 1998; Calisher, 2009.).

A hemaglutinina (HA) é codificada pelo segmento 4 sendo a glicoproteína de superfície viral mais imunogênica. Essa proteína permite o vírus ter acesso ao citoplasma celular. A HA se liga ao receptor de ácido siálico existente na superfície celular e age na fusão da partícula viral com a membrana endossômica permitindo o acesso viral ao citoplasma celular (Skehel e Wiley, 2002; Webster, 1992).

O segmento 5 é o codificador da nucleoproteína NP a qual tem a função no núcleo da célula hospedeira de encapsidar o RNA viral tornando-o estável e protegendo-o da ação de RNases (ribonucleases) (Mena et al., 1999).

No segmento 6 é codificada a neuraminidase (NA) que através da degradação do ácido

siálico do muco extracelular, auxilia na dispersão do vírus através da destruição dos receptores de HA da superfície celular.

As proteínas M1, que faz parte da matriz protéica formando uma camada elétron-densa logo abaixo do envelope viral, e M2 - que tem a função de formar os canais iônicos os quais permitem a acidificação do interior dos vírions favorecendo o desempacotamento viral - são codificadas pelo segmento 7. O segmento 8 codifica as proteínas não estruturais NS1 com função de transporte, tradução e entrelaçamento do RNAv e NS2 ainda de função desconhecida (Calisher, 2009).

Este genoma está envolvido em uma matriz protéica constituída por proteína M1, a qual está envolta por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira (Braakman e Anken, 2000). Projetam-se através da bicamada lipídica do envelope viral duas glicoproteínas de superfície, codificadas pelo genoma do vírus, denominadas HA e a NA. Ainda, uma terceira proteína, formadora de canais (M2), encontra-se inserida na bicamada lipídica (Mould et al., 2000).

Figura 3 - Modelo estrutural do vírus da influenza do tipo A.
FONTE: adaptado de Kaiser (2006).

O vírus do tipo A pode ser subdividido em outros subtipos com diferenças nas propriedades antigênicas de suas duas glicoproteínas de superfície denominadas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Por alguns anos foram classificados 15 subtipos de hemaglutininas e nove subtipos de neuraminidasas (Laver, 2002). Um décimo sexto subtipo de hemaglutinina foi recentemente descoberto em amostras de gaivota-de-cabeça-negra (*Larus ridibundus*) no norte da Europa (Fouchier et al., 2005).

Dois mecanismos principais são responsáveis pela mudança contínua na antigenicidade dos vírus da influenza, e são denominados “shift” antigênico e “drift” antigênico (Zambon, 1999).

O “drift” resulta do acúmulo de mutações que alteram o tipo de aminoácidos que compõe as proteínas, ocorrendo tanto na hemaglutinina como na neuraminidase, resultando na alteração gradual do vírus. Estas alterações vão reduzir a ligação dos anticorpos do organismo infectado e diminuir assim a imunidade que já poderia existir devido ao contato deste organismo com outros vírus da influenza, facilitando a disseminação do vírus com as modificações. Dependendo do tipo de modificação estabelecida pode ocorrer imunidade parcial. (Nakajima et al., 2000).

O “shift” pode ser definido como o aparecimento de um vírus da influenza A contendo um novo subtipo de HA ou de HA e NA, resultado da alteração drástica destas proteínas, uma vez que todo um segmento genético viral é substituído por outro segmento que codifica a mesma proteína. Este processo pode ocorrer quando duas estirpes virais de diferentes origens infectam a mesma célula hospedeira. Durante o encapsulamento do material genético pode haver rearranjos levando ao surgimento de um vírus contendo segmentos genéticos de duas estirpes diferentes (Cox e Subbarao, 2000).

A maioria da população não apresenta imunidade para estas novas estirpes podendo surgir assim novas pandemias. Além dos mecanismos de “shift” e “drift”, o ressurgimento de uma estirpe antiga do vírus pode causar por si só um novo surto. Recentemente descobriu-se que pode acontecer outro tipo de “shift” antigênico, quando um tipo de *Influenza* animal consegue transpor a barreira da espécie (Cox e Subbarao, 2000).

Através da HA as partículas virais ligam-se a receptores de ácido siálico localizados superfície celular e assim ocorre a endocitose do vírion. Esse é então liberado no citoplasma da célula hospedeira. Após a entrada viral, os nucleocapsídeos migram para o núcleo da célula e, as

proteínas com atividade de polimerase iniciam a transcrição das partículas de RNA do vírion (RNAv) em RNA mensageiro (RNAm) (Yewdell e García-Sastre, 2002). Compõem o complexo de transcriptase viral, as proteínas PB1, PB2 e PA. A polimerase PB2 inicia o processo de transcrição. A PB1 é responsável pelo processo de elongação do RNAm viral. A função da polimerase PA na transcrição primária ainda não é conhecida, no entanto este polipeptídio é necessário para a transcrição e replicação do RNAv (Nakagawa et al., 1996).

Os transcritos produzidos são utilizados na tradução das proteínas virais. Acredita-se que o aumento da concentração de NP livre dispare a mudança da síntese de RNAm (transcrição) para a síntese de RNAc (RNA complementar) e RNAv (replicação). A replicação do RNAv começa com a mudança de síntese de RNAm para RNAc e culmina com a síntese do RNAv genômico que utiliza moléculas de RNAc como molde (Honda et al., 2001).

Figura 4 - Ciclo de vida do vírus da Influenza. Passo 1- formação do endossomo. Passo 2 - migração dos nucleocapsídeos ao núcleo da célula. Passo 3a – transcrição realizada pelo complexo de polimerase viral. Passo 3b - replicação do RNAv. Passo 4- migração do RNAm para o citoplasma. Passo 5a - migração das proteínas NP, NS1 e M1 sintetizadas nos ribossomos para o núcleo celular. Passo 5b – Transporte da NA, HA e proteína M via Complexo de Golgi para a membrana celular. Passo 6 - migração dos nucleocapsídeos formados no núcleo celular para a membrana na região de fixação das HA, NA e M. Passo 7 – Saída dos novos vírions. FONTE: Modificada de NCBI([2010]).

Pouco se sabe a respeito do processo de montagem dos vírus da influenza. Acredita-se que nucleocapsídeos envolvidos por uma cápsula de proteína M1 migrem para a face interna da membrana plasmática, para onde já foram transportadas as glicoproteínas HA, NA e M2. Foi proposto que a interação de M1 com os domínios citoplasmáticos dessas 3 glicoproteínas sinalize o processo de brotamento (Hilleman, 2002).

A detecção do vírus da influenza pode ser realizada através de várias metodologias. O método laboratorial padrão para o diagnóstico de Influenza é baseado no isolamento do vírus em cultura de células (Harmon, 1992). Este método, seguido da detecção dos antígenos virais utilizando anticorpos específicos, é uma metodologia sensível e específica, mas requer infraestrutura e pessoal especializado, sendo também uma técnica demorada [cerca de 10 dias] (Murphy e Webster, 2001). Porém, outros métodos de detecção dos antígenos virais, diretamente das amostras clínicas podem ser utilizados ensaios de imunofluorescência (IFA) e imunoenzimático (ELISA) (Reina et al., 1996) e reação de hemaglutinação (Herrmann et al., 2001). Esta última permite a detecção e tipagem utilizando anticorpos específicos contra HA e NA, (Wright et al., 1995).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é um método alternativo, que permite a detecção do ácido nucléico viral, sendo mais rápido e sensível, que o método padrão (Cherian et al., 1994). A utilização da reação em cadeia pela polimerase após a transcrição reversa (RT-PCR) é descrita por vários autores para detecção, tipagem e subtipagem dos vírus Influenza (Besselaar et al., 2004; Herrmann et al., 2001; Stockton et al., 1998; Ellis et al., 1997). A *multiplex* PCR, com primers (oligonucleotídeo iniciador) específicos para os genes da H e/ou N, é utilizada na detecção dos *Influenzavirus A*, *B*, *C* e na subtipagem do *Influenzavirus A* (Besselaar et al., 2004; Pontoriero et al., 2003; Poddar et al., 2002; Choi et al., 2002; Ellis et al., 1997). Já o Real-Time PCR gerou uma maior aceitação que a PCR, por ser um método que apresenta maior rapidez, sensibilidade, reprodutibilidade e redução do risco de contaminação durante o processo (Mackay et al., 2002; Van der Vries et al., 2010).

Estudos ecológicos do vírus de influenza conduziram a hipótese que todas as que acometem mamíferos derivam de reservatórios destes vírus nas aves. O suporte desta teoria vem das análises filogenéticas das seqüências de ácidos nucléicos da influenza A. Análises do gene da nucleoproteína (NP) demonstram que os vírus da influenza aviária estão em cinco linhagens hospedeiros-específicas: eqüina antiga, que não foi isolado nos últimos 15 anos; equina recente;

gaivota; suína; e do ser humano. Os vírus humanos e os clássicos suínos, são considerados geneticamente grupos irmãos, demonstrando que tem uma origem comum. O antepassado do vírus humano e dos suínos parece ter sido um vírus aviário parecido com o vírus de influenza que circulou em porcos domésticos na Europa. Esse possui todos seus genes idênticos aos das fontes aviárias (Gorman et al., 1990; Garmelin et al., 1990).

Até mesmo a pandemia mais devastadora que se tem notícia, a gripe espanhola em 1918, teve sua origem no vírus aviário do tipo A subtipo H1N1 (Taubenberger et al., 2001).

A influenza aviária, também chamada de peste aviária, foi descrita no ano de 1878 pelo pesquisador italiano Perroncito, que a diferenciou das doenças causadas por bactérias. Em 1901 foi identificada sendo causada por um agente filtrável (vírus) por Centanni e Savunozzi. Nos Estados Unidos, a doença foi diagnosticada em Nova York infectando frangos de corte em 1924, disseminando-se por vários estados norte americanos. Outro surto ocorreu em Nova Jersey, no ano de 1929. Mas, foi apenas em 1955, que a chamada peste aviária foi identificada como sendo causada por um vírus da influenza, que atualmente é descrito com sendo do tipo A. Nos anos seguintes, vários surtos da doença com amostras de alta patogenicidade do vírus foram descritos em muitos lugares do mundo, entre eles a América do Sul e do Norte, Norte da África, Oriente Médio e Europa, incluindo a Inglaterra e o leste europeu (Berchieri Jr e Macari, 2000).

Os pools genéticos de todos os vírus de influenza aviária aparecem primariamente nas aves aquáticas, que são responsáveis pela perpetuação deste vírus na natureza. (Alexander, 2000).

O vírus da gripe, normalmente não provoca doença ou sintomas em aves aquáticas, consideradas como reservatórios dos 16 subtipos de hemaglutininas (HA) e 9 subtipos de neuraminidase (NA) . Sua replicação é preferencialmente realizada em células do trato gastrointestinal (Webster et al., 1992).

As aves aquáticas, em sua maioria, costumam se agrupar em dormitórios e áreas de nidificação, onde há a deposição de grandes quantidades de fezes. Vírus de influenza aviária tem sido isolado do material fresco de fezes colhidas nestas localidades, bem como na água dos lagos, o que indica um eficiente método de transmissão da influenza. A não virulenta natureza da infecção do vírus da influenza em aves aquáticas pode ser resultado de uma adaptação que vem ocorrendo há séculos do vírus ao hospedeiro, criando-se assim um reservatório para a perpetuação do vírus (Webster, 1998).

O vírus da influenza de origem aviária tem sido encontrado em várias infestações de

influenza em mamíferos marinhos (como nas baleias e focas), em porcos, cavalos, cachorros e em outras espécies de aves silvestres e domésticas, como no caso das criações de frango (Geraci et al., 1982; Hinshaw et al., 1986; Scholitssek et al., 1983; Horimoto et al., 1995; Capua e Alexander, 2002).

Dois grupos (de acordo com sua habilidade de provocar doença e a gravidade dos sintomas que causam) podem ser reconhecidos para o vírus de influenza do tipo A. O primeiro denominado vírus da influenza altamente patogênicos para aves (HPAI, sigla em inglês para highly pathogenic avian influenza) pode exterminar uma criação de aves domésticas. Estes vírus estão restritos aos subtipos H5 e H7. Todos os outros subtipos conhecidos causam apenas sintomas brandos, em sua maioria atacam o sistema respiratório e são designados como vírus pouco patogênicos para aves (LPAI, sigla em inglês para low pathogenic avian influenza). O vírus da HPAI tem sido combatido nas populações de aves domésticas em todo o mundo, porém pode ser novamente reintroduzido por contato das criações com aves domésticas importadas ou ainda aves de estimação ou silvestres. (The Center for Food Security & Public Health, 2010).

Apesar das infecções virais do tipo LPAI serem brandas, não podem ser ignoradas do ponto de vista comercial, pois, provocam expressiva queda na produção de ovos no período em que as aves poedeiras ficarem debilitadas (Alexander, 2000). Entre 1959 a 2004 foram registrados 24 eventos de HPAI em todo o mundo com milhões de aves domésticas indo a óbito ou sacrificadas, acarretando prejuízos de bilhões de dólares (Capua e Alexander, 2004).

Após o surgimento de um subtipo que ainda não havia infectado seres humanos ou aves, mamíferos marinhos e mamíferos domésticos suscetíveis, ocorrem normalmente epidemias devido à rápida expansão deste vírus através das populações de aves (Bridges et al., 2003). Depois de estabelecido nestas populações, um subtipo do vírus da influenza precisa alterar as propriedades antigênicas de suas duas glicoproteínas de superfície (hemaglutinina e a neuraminidase), para que possa escapar do sistema imune do hospedeiro e assim, continue a gerar novos surtos ou epidemias.

Uma das formas naturais de disseminação do vírus da influenza pelo globo poderia estar ligada então ao transporte destas estirpes do vírus da Influenza tipo A por intermédio de aves migratórias, principalmente as aquáticas, em que várias espécies não adoecem quando em contato com o vírus, servindo apenas como reservatório (Capua e Alexander, 2002).

Figura 5 - Reservatórios do vírus de influenza A. As aves aquáticas são os reservatórios primordiais de todas as viroses que acometem várias espécies de mamíferos e aves.
 FONTE: modificada de Webster (1992).

O tamanho considerável da população mundial de aves silvestres, a ausência de fronteiras, a liberdade de movimentos das aves migratórias, os vários pontos de encontro para reprodução, alimentação ou descanso entre várias espécies, a rapidez com que estes movimentos são realizados em alguns casos e o contato com o homem em situações de campo ou urbanas, fazem com que esse grupo seja considerado extremamente importante de disseminação viral. Ainda não é conhecida qual a suscetibilidade de cada uma dessas espécies migrantes de se tornar um potencial reservatório, condutor e transmissor do vírus. Para que isso fosse possível seria necessário um maior conhecimento sobre a epidemiologia do vírus da influenza em diferentes grupos de aves, informações sobre a ecologia e comportamento, além dos padrões migratórios das espécies (Soares et al., 2005).

Algumas rotas migratórias aviárias são bem conhecidas e foram agrupadas e denominadas como flyways (Figura 2) para facilitar os esforços internacionais de manejo e conservação. A definição de uma flyway pode ser descrita como “a completa extensão na qual uma espécie migratória aviária (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 e Stroud, 2006).

O monitoramento, outro ponto importante, facilitaria na obtenção de dados dos subtipos prevalentes nas populações aviárias, suas características patogênicas e antigênicas. Além disso, é essencial para a identificação de subtipos com capacidade de gerar epidemias ou até mesmo uma pandemia (Soares et al., 2005). Por intermédio do monitoramento torna-se possível formar painéis de cepas de referência que poderão ser utilizadas na fabricação de vacinas para eventuais epidemias ou pandemia causadas na população por vírus de origem aviária.

Figura 6 - Principais rotas migratórias (“flyways”) de aves que se deslocam entre as áreas de reprodução no verão e as áreas de invernada, ligando os hemisférios norte e sul.
FONTE : Boere e Stroud (2006).

O monitoramento das aves silvestres deve incluir as espécies migratórias, que em sua rota passam por vários países do mundo e assim, podem transportar vírus da influenza infectando populações de aves residentes e vice-versa. Apesar de 105 espécies de aves pertencentes a 15 famílias diferentes serem comprovadamente portadoras de vírus da influenza ou suscetíveis a infecções causadas pelo vírus, apresentando sintomas ou não, a maior variedade de subtipos e a maioria dos isolados foram obtidos dos Anseriformes, como patos, marrecos, gansos e afins

(Alexander, 2000; Olsen et al., 2006).

O vírus da influenza tem sido isolado em aves de todos os continentes, com exceção da Antártica. Até o momento existem quatro estudos que sugerem a presença deste vírus na avifauna antártica, porém esses estudos referem-se apenas a dados sorológicos (Wallensten et al., 2006b)

A Antártica é um dos menores continentes em superfície (14 milhões de quilômetros quadrados) e o mais meridional deles. Está posicionado no Pólo Sul e encontra-se quase que completamente recoberto por enormes geleiras (glaciares). Foi formado na separação do antigo continente Gondwana há aproximadamente 65 milhões de anos e seu resfriamento ocorreu nos últimos quarenta milhões de anos. Todas as adaptações da fauna antártica existente ocorreram então nesses últimos quarenta milhões de anos (Hunford, 2002).

A avifauna antártica é composta por 35 espécies de diferentes aves marinhas aquáticas das quais 19 se reproduzem no próprio continente. O restante se reproduz em ilhas oceânicas, todas pertencentes à região sub antártica. Estima-se que mais de 100 milhões de aves aquáticas marinhas vivem na costa da Antártica e ilhas adjacentes.

Os pinguins estão representados por 17 espécies no mundo, das quais 4 tem seus sítios de reprodução no próprio continente antártico, o pinguim – papua (*Pygoscelis papua*), o pinguim – antartico (*Pygoscelis antartica*), o pinguim - adélia (*Pygoscelis adeliae*) e o pinguim imperador (*Aptenodytes forsteri*) Todas as outras espécies antarticas tem sua área de vida circunscrita na região subantartica (Williams, 1995).

Figura 7 - Distribuição das espécies de pinguins no continente antártico Em rosa pinguim – adélia, em azul pinguim - antártico, em verde pinguim - papua e em laranja pinguim - rei.
 FONTE: National Geographic Society ([2010]).

A chegada do ser humano no continente antártico foi bastante recente. Há relatos do reconhecimento da Antártica pela tribo Aush da Terra do Fogo que em suas crenças sempre citavam o “país de gelo”. O chefe Maori (tribo que conquistou a atual Nova Zelândia) Ui-Te-Rangiora teria atingido a região em 650 d.C. A passagem destas duas tribos aparenta ser somente sazonal e circunscrita as ilhas ao redor, pois até o momento nenhum vestígio significativo de sua permanência foi encontrado.

A ocupação humana definitiva começa na primeira metade do século XIX, quando navios baleeiros chegavam à região das Ilhas Sandwich do Sul. Foi ainda nesse período que James Weddell e James Clark Ross descobriram os mares que hoje levam seus nomes (Izaguirre, 2000).

Nos últimos tempos o contato de seres humanos com os animais antárticos vem aumentando, não só devido às bases de pesquisas instaladas por quase todo continente, mas

também pelo aumento desenfreado do turismo, trazendo um número cada vez maior de pessoas de diversas localidades do mundo.

Desta forma, devido o número muito grande de aves aquáticas marinhas, bem como ao crescente avanço da população humana no continente antártico, o monitoramento do vírus da influenza nas populações das aves antárticas deve ser cada vez mais intensificado, como forma de se entender a dinâmica envolvida nos processos epidemiológicos desse vírus.

2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A recente ocupação do continente antártico pelo homem causa preocupação, não só pelas interferências provocadas neste frágil ambiente de baixas temperaturas, mas também pelo desconhecimento de quais são os possíveis consequências que esta nova frente de ocupação causará à própria população humana.

Estima-se que vivam no continente antártico e ilhas periféricas mais de 100 milhões de aves aquáticas marinhas. Seus hábitos de nidificação são geralmente grupais sendo que alguns ninhais podem passar de dezenas de milhares de indivíduos. Este tipo de situação, devido à aglomeração de aves e o inevitável contato com o guano que se acumula nos ninhais, propiciariam em qualquer outro local do mundo condições quase que perfeitas para a disseminação do vírus da influenza.

Até o momento, indícios da presença deste vírus na Antártica foram obtidos através de dados sorológicos de material coletado de pinguins (Wallensten et al., 2006b). A dificuldade de acesso ao continente, o deslocamento sempre muito complicado em terra, as condições inóspitas a vida humana, o específico manejo dos animais para coleta das amostras e o demorado transporte dos materiais coletados, podem estar contribuindo de forma decisiva ao não isolamento deste vírus nas populações de aves antárticas.

Alguns pesquisadores acreditam que a presença do vírus da influenza nas aves e mamíferos aquáticos na Antártica pode estar mais ligada ao carregamento deste patógeno pela migração realizada por algumas espécies de aves às zonas temperadas do planeta (Morgan, 1981; Wallensten et al., 2006a; Morgan, 1988) do que propriamente pelo contato humano.

Ocorre que, nos últimos tempos, o continente antártico tem sido cada vez mais ocupado pelo ser humano, com a instalação de bases de pesquisas e refúgios e pelo aumento desenfreado do turismo, trazendo um número cada vez maior de pessoas de diversas localidades do mundo. Este fato pode estar mudando de forma decisiva a relação de transmissão do vírus circulante, bem como os tipos de variantes envolvidas.

A necessidade de estudos que possam mapear as cepas virais que estão circulantes no ecossistema Antártico faz-se então necessário, já que o pouco conhecimento destas traz incertezas sobre a possibilidade de transmissão das cepas comuns ao ser humano para os organismos antárticos, bem como a possibilidade de variantes desconhecidas para as populações humanas que

estiveram restritas a este ambiente passem as ser carreadas e a circular por outras localidades do mundo.

3 OBJETIVOS

1. Detectar o vírus da influenza do tipo A através da RT – PCR em pinguins residentes da região Antártica.
2. Testar diferentes técnicas moleculares para a validação dos resultados positivos encontrados através da RT- PCR utilizada na detecção dos vírus da influenza tipo A em material oral e cloacal colhido de pinguins da região Antártica
3. Determinar os subtipos de influenza A nas amostras positivas para o conhecimento do pool viral existente nestas aves e comparar suas semelhanças aos pools circulantes em outras populações de animais e humanas.

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Expedição para coleta de amostras

Foram realizadas três expedições à região Antártica nas estações de verão do ano 2006-2007, 2007-2008 e 2008-2009 com a finalidade de coletar amostras. A chegada ao local, bem como a estrutura para coleta e manutenção na área de estudo, foi provida pelo Programa Antártico Brasileiro.

Figura 8 - Estrutura colocada a disposição pelo Programa Antártico Brasileiro utilizada para a realização do trabalho.

Durante as três estações de verão antártico foram realizadas coletas de material de 283 pinguins de quatro espécies diferentes. As amostras cloacais e orais foram colhidas em duplicata, uma em Trizol e outra em meio mínimo essencial Eagle (MEM), sendo o soro e o hematócrito remanescente coletado somente em uma única amostra por ave, perfazendo um total de 1132 amostras.

No ano de 2006 a coleta de amostras foi toda concentrada na península Keller, local onde se encontra sediada a Base Antártica Brasileira Comandante Ferraz (62°08'S, 58°25'W) que se localiza na Baía do Almirantado, na ponta da grande península Antártica. A Ilha Rei George é a maior da região, distante 120 km da costa da Antártica e 900 km do continente Americano. O período de coleta para essa expedição foi de 20 de novembro a 6 de dezembro.

A área costeira da ilha é habitada por focas-de-weddell, lobos e lobos-marinhos, e diversas espécies de aves incluindo pinguins. A ocupação humana da Ilha Rei George limita-se às estações de pesquisa pertencentes à Argentina, Brasil, Chile, China, Coréia do Sul, Peru, Polônia, Rússia e Uruguai. A maioria das estações é permanente e realizam pesquisas principalmente nas áreas de biologia, ecologia, geologia e paleontologia (Scar, 2008).

As amostras dos pinguins manejados no ano de 2006 foram colhidas nas proximidades do Módulo de Química (container laboratório situado a aproximadamente a 800 m da Estação Antártica Comandante Ferraz), na Punta Plaza (localidade ao sul da EACF), na Punta Hennequin (localidade ao norte da EACF) e no Refúgio 1 (container abrigo localizado ao sul da EACF) ou durante o deslocamento da equipe entre as localidades citadas.

Figura 9 - Imagem de satélite mostrando a localização da Estação Brasileira Comandante Ferraz, na Ilha Rei George, ponta da grande Península Antártica.

FONTE: Programa GoogleEarthTM ([2010]).

Figura 10 - Mapa da Ilha Rei George mostrando a localização da Estação Brasileira Comandante Ferraz e os pontos de coleta de material em Punta Plaza, Punta Heinnequin, Refúgio 1 e o Módulo de Química.
 FONTE: modificado de Wikipedia ([2010]).

A Ilha elefante ($61^{\circ}08'S$, $55^{\circ}07'W$), que faz parte do território Britânico da Antártica, é uma ilha montanhosa e coberta de gelo localizada ao largo da costa da Antártica e pertencente ao arquipélago das Ilhas Shetland do Sul, no Oceano Antártico. Situa-se a 1.209 km a oeste-sudoeste das Ilhas Geórgia do Sul e Sandwich do Sul, 940 km das Ilhas Malvinas e 890 km a sudeste do Cabo Horn. Neste local foram coletadas as amostras no verão de 2007/2008 no período de 04 de dezembro a 21 de dezembro de 2007.

Sua fauna é bastante rica, podendo ser encontrados com facilidade em suas praias, animais como elefantes-marinhos, focas-de-weddell, lobos-marinhos e focas-caranguegeiras. Sua avifauna é também bastante variada com a presença de espécies como pinguim-papua, pinguim-antártico, pinguim-rei, pinguim-macaroni, biguas, albatrozes, skuas, trinta-reis e pombas-do-cabo entre outras.

Nesta ilha foi montado um container refúgio brasileiro com capacidade para abrigar 6 pesquisadores. As atividades de preparação e acomodação do material coletado foram realizadas em barraca laboratório construída próximo ao refúgio para este fim.

Figura 11 - Imagem de satélite mostrando a localização da Ilha Elefante (A).
FONTE: programa GoogleEarthTM ([2010]).

Figura 12 - Mapa da Ilha Elefante mostrando a localização do Refúgio para Estudos e o ponto de coleta de material
FONTE: modificado de Wikipedia ([2010]).

Figura 13 - Vista parcial da Ilha Elefante quando da chegada com o helicóptero.

No verão de 2008/2009 a coleta de amostras foi toda concentrada novamente na península Keller, local onde se encontra sediada a Base Antártica Brasileira Comandante Ferraz ($62^{\circ}08'S$, $58^{\circ}25'W$) nos mesmos pontos utilizados durante o ano de 2006. Alguns pinguins foram também capturados neste período durante o deslocamento da equipe entre as áreas de coleta. O período de coleta para a expedição do verão de 2008/2009 foi de 03 de dezembro de 2008 a 17 de março de 2009.

4.1.1 Coleta de Amostras

Durante as três expedições para coleta de material foram amostrados 283 pinguins. Essas aves foram capturadas com a utilização de puçás com boca de 60 cm de diâmetro, saco de 1m de comprimento e cabo de 1,8 m.

As capturas foram direcionadas apenas a indivíduos vagantes, ou seja, aves que não estavam nas proximidades de ninhais e que passavam a maior parte do tempo em atividades de alimentação ou de secagem seguida por arrumação das penas. Este cuidado foi tomado devido à

época da coleta coincidir com a de acasalamento dessas aves, minimizando assim possíveis impactos negativos a atividade reprodutiva.

Após a captura os pinguins eram imediatamente manejados e as amostras coletadas. Antes da soltura os animais receberam uma marcação na região peitoral com a utilização de tinta atóxica que permitiu assim o reconhecimento das aves que já haviam passado pelo processo de coleta de material, evitando repetições.

Toda a coleta de amostras de material cloacal e oral foi realizada com auxílio de zaragatoas. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em criotubos com meio Eagle para transporte, este contendo 1,0% de albumina bovina, 2000 unidades de penicilina G, 2,5 µg de estreptomicina, 25 µg de fungisona e 20 % de glicerina. Uma duplicata destas mesmas amostras foi acondicionada e transportada em Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carsbad, California, Estados Unidos). As amostras contendo conteúdo oral e cloacal foram acondicionadas em tambores de nitrogênio líquido no momento da coleta em campo até o transporte para o laboratório. Os tambores de nitrogênio foram acondicionados na câmara fria do porão do navio a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ para melhor conservação até chegada ao Brasil. Quando da chegada ao laboratório foram transferidas para freezer $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Figura 14 – Captura de exemplar de pinguim, próximo ao módulo de química.

Figura 15 – Utilização de zaragatoa para coleta de material oral.

Figura 16 – Retirada de sangue da artéria femoral.

Figura 17 - Laboratório do módulo de química, Ilha Rei George.

Figura 18 - Barraca laboratório (vermelha e branca) próximo ao refúgio, Ilha Elefante.

Figura 19 - Pinguim marcado antes da soltura com tinta atóxica.

4.2 Extração de RNA das Amostras Virais

A extração das 100 primeiras amostras colhidas no ano de 2006 foi realizada no laboratório do Módulo de Química da Estação Antártica Comandante Ferraz.

A extração de RNA das 183 amostras do ano de 2007 e 2008 foi feita no laboratório NB-2 (Laboratório de Biossegurança Nível 2) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Após o descongelamento e homogeneização de cada amostra de material cloacal e oral transportadas em meio Eagle uma alíquota de 200µl foi retirada. A extração do material genético viral de cada alíquota foi realizada com a utilização do NucliSENS ® Iso Kit (bioMérieux, Lyon, France) com o protocolo on - board conforme instruções do fabricante.

4.3 Transcrição Reversa

Para a obtenção do cDNA (DNA complementar) foi utilizado o kit Hight Capacity cDNA Archive seguindo as orientações do fabricante (Appied Biosystems, Carlsbad, California, Estados Unidos), no qual, 50 µl de RNA extraído foi diluído em tampão contendo 50 pMoles (Picomol

10^{-12} mol) de Random primers e demais reagentes, obtendo-se um tampão de reação com 50 mM (milimolar) de Tris-HCl [com Potencial hidrogeniônico (pH) 8.3 a 25 °C / 75 mM de KCl / 3 mM de $MgCl_2$ (10x RT Buffer), 10 mM de Dithiothreitol, 50 U de MultiScribe RT enzyme, 02 U de Inibidor de Ribonuclease, 1.5 mM de dNTP (Deoxiribonucleosídeos 5'- trifosfatados) e água UltraPure (Gibco, Carlsbad, California, Estados Unidos) q.s.p (quantidade suficiente para). 100 μ l. A mistura foi incubada a 25 °C por 10 minutos (min) e 37 °C por 120 min no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). O cDNA foi armazenado em freezer -70 °C até o momento de sua amplificação.

4.4 Reações de PCR para a Detecção Viral

A amplificação foi realizada a partir de 5 μ l de cDNA acrescido de 25 pMoles dos primers FluA + (5'ctaagggtttcaccgaaga 3') e FluA - (5'cccattctcattactgettc 3') (Claas et al.,1992), 2,5 U de taq DNA polimerase (Biotools, Madrid, Espanha), 10 mM de cada dNTP e água ultra pura tratada com DEPC (dietilpirocarbomnato). A sequência alvo para os primers FluA+ e FluA - é uma região conservada do segmento genômico 8 (NS), para todos os subtipos virais do tipo A com 192 pares de base. As amostras foram amplificadas no termociclador 9700 (Applied Biosystems). O programa de ciclagem utilizado consistiu de 35 ciclos de 45 s a 94 °C, 45 s a 56 °C 1 min a 72 °C, e um ciclo final de 5 min a 72 °C. A Figura 20 mostra a localização dos primers no genoma viral.

Figura 20 - Sequência completa do gene NS do segmento 8 (A/New York/3487/2009_H3N2), com a região complementar ao iniciador em negrito. A seta indica a direção de síntese dos iniciadores (vermelho FluA+ e azul FluA -). Produto esperado no tamanho de 192 pares de bases.

4.5 Eletroforese em Gel de Agarose

Para a preparação desta etapa do experimento em um volume de 15 µl do produto amplificado de cada amostra dos 283 pinguins foi adicionado 3 µl de corante para amostra 6X (azul de bromofenol 0,25% e ficol tipo 400 15%), seguindo-se análise por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,2% (Invitrogen Life Technologies), em tampão TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0, 1 mM EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético). Os géis de agarose foram marcados com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg / ml (mililitro) (Invitrogen Life Technologies). Após a corrida de aproximadamente 20 minutos, as bandas foram visualizadas por iluminação com luz ultravioleta (uv) e o gel foi fotografado.

4.6 PCR em Tempo Real

A amplificação em tempo real foi efetuada em placa de PCR de 96 orifícios. Para a realização desta etapa foi utilizado o “Kit de detecção da Invitrogen Universal PCR Master Mix” com os primers Influenza A INFA_F (5’gac cra tcc tgt cac ctc tga c 3’) e INFA_R (5’agg gca tty

tgg aca aak cgt cta 3'). A sequência alvo para os primers INFA Fe INFAR é uma região conservada do segmento genômico 7 que codifica as proteínas M1 e M2 da matriz protéica para todos os subtipos virais do tipo A, com 106 pares de base. O protocolo consiste na utilização 3µl de cDNA diluído em tampão 20 mM de Tris-HCl [pH 8.4] / 50 mM de KCl / 2 mM de MgCl₂ (Biotools), 10 pMoles de cada primer (INFA_R e INFA_F), 10 pMoles da sonda M4169, 1 µl de Taq DNA Polimerase (Biotools), 0.2 mM de cada dNTP e água UltraPure q.s.p. 25 µl. As placas foram amplificadas no termociclador Real Time 3300 PCR System (Applied Biosystems). A amplificação foi efetuada a partir de uma etapa de desnaturação de 94 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C por 15 se, para desnaturação das fitas de DNA; 56 °C por 30 s, para o pareamento dos primers (fase no qual, foram coletados os dados de fluorescência); e 72 °C por 15 s para a extensão das fitas de DNA. Como controle positivo foi incluído uma amostra de pulmão humano infectado com o vírus da influenza e como controle negativo foi utilizada água livre de DNA/RNase esterilizada (Gibco).

Figura 21-Sequência completa dos genes M1 e M2 contidos no segmento 7.(A/New York/3487/2009_H3N2), com a região complementar ao iniciador em negrito. A seta indica a direção de síntese dos iniciadores (vermelho INFA_F e azul INFA_R). Produto esperado no tamanho de 107 pares de bases

4.7 PCR GENESCAN (Gs)

A PCR foi realizada a partir de 3µL do cDNA diluído em tampão Tris-HCl 20 mM [pH 8.4] / 50mM de KCl / 1.5 mM de MgCl₂ (Applied Biosystems), 25 pMoles de cada primer FluA + (5'ctaagggtttcaccgaaga 3') marcado com FAM e FluA – (5'cccattctcattactgcttc 3') (Claas et al., 1992), 1U de Taq DNA Polimerase (Applied Biosystems), 4µL de dNTP [1.25mM] e água Milli-Q q.s.p. 25µL. A sequência alvo para os primers FluA + e FluA – foi uma região conservada do segmento genômico 8 (NS) para todos os subtipos virais do tipo A. As amostras foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), a partir de uma etapa 94 °C por 2 min seguida de 35 ciclos de 94 °C/45min, 54 °C/45 s e 72 °C/45s e uma etapa final de 72 °C por 5 min. Os produtos amplificados foram estocados a 4 °C.

4.7.1 Detecção dos Produtos Amplificados

Os produtos da PCR foram analisados e quantificados utilizando o Analisador Automático de DNA ABI-Prism modelo 310 (Applied Biosystems), com detecção para marcadores fluorescentes, utilizando o programa GeneScan. Um µl do produto da PCR foi misturado com 11µl de formamida deionizada e 0,75µl de sizestandard (GeneScan TAMRATM 500). A inclusão do padrão de peso molecular em cada amostra permitiu a compensação de eventuais variações que pudessem ocorrer entre as corridas eletroforéticas. Essa mistura foi colocada no Termociclador para denaturação: 95 °C por 3 min e imediatamente colocada em gelo até a análise no aparelho. Os produtos foram submetidos a corrida eletroforética no interior de um capilar medindo 47cm de comprimento, preenchido por um polímero POP-4 (Applied Biosystems). A injeção da amostra no capilar durou 5 s e a eletroforese foi realizada durante 40 min a 15.000 volts (v) e 60 °C.

Os fragmentos marcados foram detectados por um feixe de laser e por uma câmara CCD utilizando-se um filtro virtual “A”, que em seguida foram analisados pelo programa ABI 310 GeneScan (Applied Biosystems), produzindo eletroferogramas com dados quanto ao tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) e quanto à intensidade de fluorescência em Unidades Relativas de Fluorescência (URF).

4.8 Sequenciamento do Material Genético

Os produtos da PCR em Tempo Real das amostras positivas foram purificados e posteriormente sequenciados. Para a purificação foi utilizado o método de precipitação por isopropanol, no qual 50 µl do produto amplificado foi adicionado a um microtubo contendo 300 µl de isopropanol 75%, centrifugado a 12000g por 20 min à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado. Houve mais uma lavagem com 200 µl de etanol 75%, seguido de uma última centrifugação de 8000g por 8 min, o sobrenadante descartado e o precipitado ressuspendido em 50 µl de água livre de DNA/RNase (Gibco).

Para a reação de sequenciamento do DNA, foi utilizado o BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit - Ampli Taq DNA Polymerase (Applied Biosystems), no qual 2 µl de tampão de sequenciamento (save money-5X), 2 µl de reagente de sequenciamento (Kit-BigDye Terminator), 3 µl do primer (1p/mol), 1 µl de água 56 estéril e 2 µl do produto de qPCR purificado, totalizando um volume final de 10 µl, foram submetidos ao ciclo de sequenciamento, no termociclador Eppendorf 2500: 96 °C por 1 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 45 s, 50 °C por 54 s e 72 °C por 2 min. O sequenciamento foi realizado nos dois sentidos, ou seja, utilizando-se os dois primers e em triplicatas, a fim de identificar possíveis erros de leitura das bases. A detecção dos nucleotídeos marcados por fluorescência foi realizada no sequenciador automático de DNA ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems) A busca inicial de similaridade das sequências obtidas em relação ao controle positivo para influenza do tipo A foi comparada com outras disponíveis no GenBank da página do NCBI (National Center for Biotechnology Information no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e foi realizada pelo programa BLAST versão 2.0, disponível no mesmo endereço.

4.8.1 - Processamento e alinhamento das sequências obtidas com as do segmento 8 do vírus da influenza A .

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas juntamente com sequências adquiridas do GenBank do segmento 8 do vírus da influenza A, codificador das proteínas NS, para todas as variantes de HA e NA encontradas no banco de dados, tendo-se o cuidado de se eleger sequências encontradas em aves, suínos e no homem. Utilizando o programa BioEdit v7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA) as sequências foram alinhadas e então

convertidas para o programa MEGA versão 4.0 (Tamura et al., 2007). Os arquivos foram analisados, com o referido programa, tendo como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par.

Tabela 1 – Sequencias obtidas no GeneBank do segmento 8 do vírus da influenza A utilizadas para comparação com as amostras positivas de pinguins.

Nº GENBANK	HOSPEDEIRO	TIPIFICAÇÃO	ANO
CY003911	ave	H2N1	1988
CY003926	ave	H2N7	1986
CY003933	ave	H2N1	1988
CY005807	ave	H1N1	1976
GU186636	ave	H1N1	1976
HQ200446	ave	H5N1	2006
CY069593	humano	H5N1	2004
HM440135	suíno	H5N1	2007
AB265204	ave	H5N1	2006
AF115288	humano	H5N1	1997
AF400790	ave	H9N2	1998
EF015555	ave	H7N7	2003
GU053125	humano	H7N7	2003
CY069497	humano	H3N2	2009
EU097925	humano	H1N2	2003
CY068738	humano	H3N2	2009
CY069561	humano	H3N2	2009
CY006415	humano	H1N2	2003
CY069553	humano	H1N1	2009
CY069545	humano	H1N1	2009
CY072538	humano	H1N1	2010
CY073769	humano	H1N1	2009
HM461766	suíno	H1N1	2008
EU258947	suíno	H2N3	2006
GQ452239	suíno	H1N1	2004
EU871917	ave	H5N5	2000
GU050796	ave	H2N1	2002
EU742892	ave	H7N2	2001
CY060400	ave	H2N1	2002
FJ432774	ave	H1N1	2006
DQ090051	ave	H7N1	2000
AB546192	ave	H7N7	2008
FJ461600	suíno	H5N2	2008
CY061606	ave	H7N7	1976
HM060076	ave	H10N1	2007

4.8.2 Análise Genealógica

Os arquivos gerados pelos programas de alinhamento BioEdit v7.0.9 (1997-2007, Tom Hall, Ibis Biosciences Carlsbad, CA) e convertidos para o MEGA 4.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis software), disponível no site <http://www.megasoftware.net/mega.html> (Tamura et al., 2007) foram utilizados para as análises genealógicas para as amostras de vírus da influenza. A árvore de máxima verossimilhança (maximum likelihood) com as sequências de vírus da influenza A foi gerada com uma busca heurística (heuristic search) com o algoritmo “Neighborn joining” e para verificar a sustentação de ramos nas topologias da árvore obtida. Análises de bootstrap com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985) e reamostragem de 200 caracteres também realizadas com o programa MEGA 4.0.

4.9 Inoculação em ovos embrionados

Com a finalidade de isolamento do vírus da influenza A, as 283 amostras orais/cloacais foram inoculada em ovos embrionados no Laboratório de Virologia do “St. Jude Children’s Research Hospital” em Memphis, Estados Unidos da América em março de 2008.

4.9.1 Preparação dos Antibióticos

Antes da inoculação das amostras, foi realizado o preparo da solução de antibióticos. Apesar de já existirem antibióticos no meio de transporte, um reforço foi necessário para evitar a proliferação de bactérias nos ovos embrionados.

Os antibióticos foram preparados para conter em 1 ml, 200 mil unidades de penicilina, 40 mil unidades de estreptomicina, 20 mil unidades de polimicina B e 5 mg de gentamicina. O concentrado de antibiótico foi colocado em 100 ml de PBS estéril.

As amostras foram, então, misturadas em com a utilização de “vortex” e uma alíquota de 0,2ml foi retirada de cada uma delas em seringa de insulina já contendo 0,2 ml da solução de antibióticos.

4.9.2 Preparação dos Ovos e Inoculação

Os ovos foram inspecionados em ovoscópio para a avaliação de sua viabilidade. Todos os embriões mortos ou com pouca mobilidade foram descartados.

Após este procedimento os ovos foram marcados e aspergidos com álcool a 70%. Os embriões possuíam 10 dias de incubação. Após a inoculação, os ovos foram incubados por mais 3 dias a 35 °C.

A inoculação foi realizada com seringas de insulina em aberturas previamente feitas com a utilização de uma lixadeira portátil. Cada uma das amostras foi inoculada na cavidade alantóica de dois ovos. A abertura feita na casca do ovo foi fechada com parafina líquida para evitar possíveis contaminações.

Figura 22 - Ovos marcados e prontos para a inoculação.

Figura 23 - A - Lixadeira portátil utilizada para fazer a abertura na casca dos ovos e permitir a entrada da agulha na cavidade alantóica. B- Inoculação de ovos embrionados com 0,2ml de amostra.

4.9.3 Colheita do material incubado

Após os 3 dias de incubação a 35 °C, os ovos foram inspecionados quanto à saúde dos embriões e aqueles que estavam mortos foram marcados. Os ovos foram, então, colocados em geladeira a 4 °C por 12 horas. O resfriamento mata o embrião e facilita a colheita do líquido alantóico devido à contração dos vasos sanguíneos do interior do ovo, prevenindo a contaminação do fluido alantóico com sangue do embrião.

Antes da colheita foi realizada uma amostragem de cada ovo para a verificação da existência viral. Para isso, a parafina que cobre a abertura implantada na casca do ovo foi derretida para a retirada de uma amostra de aproximadamente 1,5 ml. Com o auxílio de pipetas Pasteurs esta alíquota foi acondicionada em um tubo de micro centrífuga. Este material foi utilizado em testes de esterilidade e em testes de hemaglutinação. O restante do líquido alantóico foi estocado para nova inoculação (segunda passagem) em ovos embrionados.

4.9.4 Teste de esterilidade

Uma placa de Petri contendo ágar sangue foi utilizada para realização do teste de esterilidade das alíquotas retiradas.

Cada placa utilizada foi dividida para receber dez cultivados. Para isso, o fundo da placa foi dividido em 10 partes com a utilização de uma caneta. Cada divisão recebeu uma alíquota de cerca de 2µL do fluido alantóico.

Figura 24 - Placas de Petri contendo ágar sangue para a execução dos testes de esterilidade dos cultivados.

4.9.5 Teste de Hemaglutinação

Para o teste de hemaglutinação (H), uma alíquota de 50µl do cultivado foi colocada em uma cavidade da primeira linha de uma placa de titulação de 96 orifícios. Outra alíquota, de 100µl, do mesmo cultivado foi colocada em uma cavidade da segunda linha, ou seja, na cavidade imediatamente abaixo da primeira alíquota. As linhas C e D contêm 50µl de PBS (Solução salina tamponada com fosfatos). Cada alíquota passa por uma diluição seriada até 1:4. Após a distribuição dos cultivados na placa, uma alíquota de 50µL de uma solução de 0,5% de hemácias de galinha em PBS foi distribuída nas linhas B, C e D. A leitura das placas foi realizada após meia hora.

As linhas de E a G foram utilizadas por outras alíquotas do fluido alantóico, assim, cada placa pode ser utilizada por 12 cultivados, 6 em cada lado da micro placa . Este procedimento foi repetido para todas as 283 amostras de pinguins.

4.9.6 Teste rápido para detecção de influenza

Foi executado teste rápido para a detecção de antígeno viral para amostra 35. Para isso foi utilizado o kit comercial “Directigen Flu A+B” (BD: Becton, Dickinson and Company, Le Pont Claix, França). O teste foi realizado de acordo com as instruções do fabricante.

5 RESULTADOS

5.1 Amostras Coletadas

Foram colhidas amostras de 283 exemplares de pinguins pertencentes a quatro espécies diferentes, o pinguim - papua *Pygoscelis papua*; o pinguim-adélia, *Pygoscelis adeliae* ; o pinguim-antártico *P. Antarctica*; e o pinguim - rei *Aptenodytes patagonicus*, este último raro para a região estudada tendo sido capturados somente dois exemplares.

Figura 25 – Pinguim-papua, *Pygoscelis papua*

Figura 26 – Pinguim-adélia, *Pygoscelis adeliae*

Figura 27 – Pinguim-antártico, *Pygoscelis antarctica*.

Figura 28 – Pinguim- rei, *Aptenodytes patagonicus*.

A proporção entre as espécies de pinguins amostradas durante a primeira expedição realizada no ano de 2006 bem como a quantidade de indivíduos pode ser observada na Tabela 2 e na Figura 29.

Tabela 2 – Número de pinguins amostrados por espécie no verão antártico de 2006/2007.

ESPÉCIE AMOSTRADA	NÚMERO DE ESPÉCIMES AMOSTRADOS
<i>Pygoscelis adeliae</i>	57
<i>Pygoscelis antarctica</i>	8
<i>Pygoscelis papua</i>	35
TOTAL	100

Figura 29– Proporção entre as espécies de pinguins amostradas durante o verão antártico de 2006/2007.

As coletas de amostras na estação de verão de 2007-2008, foram realizadas entre os dias 4 de dezembro e 8 de dezembro de 2007 na Ilha Elefante. No total foram coletadas 98 amostras de quatro espécies diferentes de pinguins antárticos. A proporção de cada espécie de pinguim amostrada durante esta temporada pode ser observada na Tabela 3 e na Figura 30.

Tabela 3 – Número de pinguins amostrados por espécie no verão antártico de 2007/2008.

ESPÉCIE AMOSTRADA	NÚMERO DE ESPÉCIMES AMOSTRADOS
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	2
<i>Pygoscelis antarctica</i>	65
<i>Pygoscelis papua</i>	31
TOTAL	98

Figura 30 – Proporção entre as espécies de pinguins amostradas durante o verão antártico de 2007/2008

O período de coleta para a expedição do verão de 2008/2009 foi de 03 de dezembro de 2008 a 17 de março de 2009 onde foram coletadas 85 amostras de três espécies diferentes de pinguins antárticos. A proporção de cada espécie de pinguim amostrada durante esta temporada pode ser observada na Tabela 4 e na Figura 31.

Tabela 4 – Número de pinguins amostrados por espécie no verão antártico de 2008/2009.

ESPÉCIE AMOSTRADA	NÚMERO DE ESPÉCIMES AMOSTRADOS
<i>Pygoscelis adeliae</i>	48
<i>Pygoscelis antarctica</i>	12
<i>Pygoscelis papua</i>	25
TOTAL	85

Figura 31 – Proporção entre as espécies de pinguins amostradas durante o verão antártico de 2008/2009.

A proporção de cada espécie de pinguim amostrada e o número de indivíduos capturados durante as três estações de verão antártico pode ser observada na Tabela 5 e na Figura 32.

Tabela 5 – Número de pinguins amostrados por espécie nas três estações de verão antártico.

ESPÉCIE AMOSTRADA	NÚMERO DE ESPÉCIMES AMOSTRADOS
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	2
<i>Pygoscelis antarctica</i>	85
<i>Pygoscelis papua</i>	91
<i>Pygoscelis adeliae</i>	105
TOTAL	283

Figura 32 – Proporção entre as espécies de pinguins amostradas nos três verões antárticos

5.2 Detecção Viral Através da Reação de PCR

Foram realizadas reações de PCR para a detecção viral com leitura em gel de agarose para as 283 amostras colhidas. Obtiveram-se resultados positivos para as amostras de número 16/06, 21/06, 23/06, 42/06, 45/06, 50/06, 77/06 e 86/06. (Tabela 6). Das demais amostras testadas 35 apresentaram uma banda fraca próxima a 192 pares de bases, porém foram repetidas e não foi confirmada a sua positividade. As demais amostras foram todas negativas.

Tabela 6 - Amostras com resultado positivo testadas pelo método de PCR com visualização em gel de agarose.

(continua)

Identificação da amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
16/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Pos.
21/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Pos
23/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Pos
42/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Pos
45/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Pos

(conclusão)

Identificação da amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
50/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis papua</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Pos
77/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Pos
86/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Pos

Tabela 7 - Tabela das 35 amostras que apresentaram bandas fracas e foram novamente testadas pelo método de PCR com visualização em gel de agarose.

(continua)

Identificação da amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
01/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
08/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
13/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
25/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
26/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
29/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
33/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
34/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
36/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
43/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
49/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
52/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
54/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
55/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
59/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
60/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
61/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
63/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo

(conclusão)

Identificação da amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
67/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
68/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
69/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
83/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
88/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
97/07	pinguim-rei	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
98/07	pinguim-rei	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	negativo
12/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	03/12/2008	Frente EACF	negativo
26/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	negativo
27/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	negativo
49/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	09/12/2008	Frente EACF	negativo
55/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	10/12/2008	Frente EACF	negativo
58/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	10/12/2008	Frente EACF	negativo
65/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	11/12/2008	Frente EACF	negativo
72/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	12/12/2008	Punta Plaza	negativo
80/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	09/03/2009	Punta Plaza-Refúgio 1	negativo
149/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	17/03/2009	Módulo de Química	negativo

Figura 33 - Resultado positivo do RT - PCR com leitura em gel de agarose (amostra 16/06 de *Pygoscelis adeliae*).

5.3 Detecção Viral Através do PCR em Tempo Real

Foram realizadas reações de PCR em Tempo Real, como descrito, para as amostras consideradas positivas nas reações de PCR e para as 35 amostras que apresentaram uma banda fraca na análise dos géis da RT - PCR. Foi confirmada através deste método a positividade para o vírus da influenza tipo A em oito amostras, estas positivas também para o método de RT – PCR (amostras 16/06, 21/06, 23/06, 42/06, 45/06, 50/06.77/06 e 86/06). As demais 35 amostras testadas com a utilização desta metodologia foram consideradas negativas.

Figura 34 - Resultado do PCR em Tempo Real da amostra 86/06, demonstrando em vermelho a curva de amplificação do controle positivo e em azul a curva de amplificação da amostra.

5.4 Detecção Viral Através de Técnica de GeneScan

Foram realizadas reações de PCR com indicador marcado para a detecção viral por GeneScan, utilizando-se da metodologia descrita. As amostras testadas foram as de número 16/06, 21/06, 23/06, 42/06, 45/06, 50/06.77/06 e 86/06. As oito amostras mostraram-se positivas para o vírus da influenza A. Como no caso descrito para o PCR em tempo Real as 35 amostras que apresentaram uma banda fraca na análise dos géis da RT – PCR foram também testadas com a utilização desta metodologia. Nenhuma das 35 amostras testadas apresentou resultado positivo.

Figura 35 – Resultado do PCR GeneScan da amostra 16/06, demonstrando em vermelho a curva de amplificação do controle positivo e em azul a curva de amplificação da amostra.

5.5 Sequenciamento

Procedeu-se o sequenciamento das amostras constatadas como positivas através pelos métodos de PCR com leitura em gel de agarose, PCR em Tempo Real e GeneScan. Das oito amostras testadas somente quatro puderam ser sequenciadas. São elas as amostras 16/06, 21/06, 23/06 e 86/06.

Para a comparação das seqüências das amostras foi realizado o alinhamento destas seqüências de nucleotídeos (nt) com as de um controle positivo para o vírus da influenza A H1N1 (Figura 36) visando a a confirmação de sua similaridade.

Com o auxílio do programa Bio Edit Sequence Alignment Editor, também foi possível criar uma tabela que mostra a porcentagem de identidade entre todas as seqüências (Tabela 8)

Figura 36 - Comparação entre as seqüências de nucleotídeos indicam uma similaridade entre as seqüências obtidas e as do controle.

Tabela 8 - Matriz comparativa da identidade verificada entre as amostras positivas para influenza A e o controle positivo H1N1.

	Control H1N1	Adeliae 16	Papua 23	Papua 21	Papua 86
Control H1N1	ID	1	1	0,984	0,968
Adeliae 16	1	ID	1	0,984	0,968
Papua 23	1	1	ID	0,984	0,968
Papua 21	0,984	0,984	0,984	ID	0,984
Papua 86	0,968	0,968	0,968	0,984	ID

5.5.1 Análise genealógica

Através da análise do fragmento de 192 nucleotídeos do gene codificador para a nucleoproteína NS sequenciado das amostras 16/06, 21/06, 23/06 e 86/06 e comparada com sequencias obtidas no GenBank para o mesmo segmento, obteve-se uma árvore de máxima verossimilhança (maximum likelihood) como pode ser visualizada na Figura 37.

Foram escolhidas seqüências do segmento 8 do vírus da influenza A no GenBank de todas as variações possíveis entre a hemaglutinina e a neuraminidase, tendo sido selecionadas 465 sequencias de vírus que infectaram aves porcos e seres humanos em vários continentes. Para a formação da árvore foram retiradas as sequencias de menor similaridade

Figura 37 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança (maximum likelihood), para nucleoproteína NS construída pelo programa MEGA 4.0 e realizada por uma busca heurística (heuristic search) com o algoritmo “Neighbor joining”. Para verificar a sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas, análises de bootstrap com 1000 réplicas.

5.6 Inoculação em Ovos Embrionados.

5.6.1 Teste de esterilidade

Todos os testes de esterilidades realizados para as 283 amostras de pinguins foram negativos, ou seja, nenhum contaminante foi detectado nos cultivados em ovos embrionados.

5.6.2 Teste de hemaglutinação

No teste de hemaglutinação realizado 6 amostras foram testadas em cada lado da placa. Como resultado constatou-se que o segundo cultivar (segundo ovo) da amostra 31 (pinguim – papua coletada próximo ao módulo de química em 2006) matou o embrião. A amostra 35 (pinguim – papua coletada próximo ao módulo de química em 2006) aglutinou as hemácias de galinha. As demais amostras formaram um aglomerado de hemácias no fundo das cavidades.

Com a exceção do cultivado da amostra 35, todas as outras 282 amostras cultivadas foram negativas, tanto na primeira passagem quanto na segunda passagem em ovos embrionados

Figura 38 - Resultados obtidos em uma das placas realizadas para o teste de hemaglutinação.

5.6.3 Teste rápido para detecção de influenza

O teste rápido para amostra 35 foi negativo indicando que a aglutinação de hemácias constatada pelo teste de hemaglutinação se tratava de um falso positivo. Além disso, as reações de PCR feitas com essa amostra também foram negativas. A origem do aglutinador de hemácias na placa de titulação permanece não identificada. O teste rápido foi executado duas vezes, sendo, a amostra 35 negativa para ambas tentativas.

Figura 39 - Teste rápido para a amostra 35. Para ser positiva, deveria aparecer na primeira cavidade o desenho de um triângulo. Neste caso, a amostra 35 foi negativa para este teste.

6 DISCUSSÃO

A metodologia utilizada visou principalmente a coleta da maior quantidade possível de amostras de pinguins que tivessem como área de vida a região antártica. As espécies do gênero *Pygoscelis* foram escolhidas principalmente por formarem grandes colônias e por terem seu deslocamento circunscrito à região antártica e subantártica, não migrando nem estabelecendo populações fora dessas.

A estratégia de escolha de localidades próximas a ninhais de pinguins foi tomada como base para determinação dos pontos de coleta, pois nesses locais as aves estão em maior concentração, proporcionando assim uma maior facilidade de captura.

A área da Estação Brasileira Comandante Ferraz, explorada nos verões antárticos de 2006-2007 e 2008-2009, foi escolhida por estar situada nas proximidades de duas grandes colônias de pinguins. Uma localizada no entorno da Base Polonesa de Arctowski (sítio de especial interesse científico -SSSI 8-, abrigando colônias reprodutivas de pinguins do gênero *Pygoscelis*) e a outra o refúgio norte - americano Copacabana, onde está localizada uma grande pinguineira com casais de *P. papua* e *P. adeliae*. A proximidade desses dois sítios faz com que as praias na região da estação brasileira sejam sempre visitadas por casais ou indivíduos isolados que descansam entre um forrageamento e outro.

A escolha da ilha Elefante durante o verão de 2007-2008, como terceiro ponto, baseia-se no fato de que nesta localidade se formam grandes colônias de pinguins das três espécies do gênero *Pygoscelis*.

Dificuldades e limitações da coleta foram encontradas pela própria logística e permissões envolvidas. Na Antártica todo o trabalho de campo está totalmente limitado a algumas condicionantes, tais como, a logística de transporte fornecida pelo Programa Antártico Brasileiro juntamente com a Marinha do Brasil, as condições climáticas e as cotas de captura e manejo de animais para este tipo de pesquisa com as particularidades que devem ser respeitadas devido à época de reprodução.

A logística de transporte envolve as facilidades utilizadas para o deslocamento entre os sítios de coleta onde foram utilizados vários equipamentos com esta finalidade, tais como quadriciclos, botes infláveis e helicóptero.

Na Antártica as condições climáticas podem limitar as saídas a campo. Todos os dias as condições meteorológicas tem de ser consultadas antes do início dos trabalhos, sendo que a

captura, manejo e coleta de material das aves em dias de ventos fortes ou nevascas é totalmente vetada por conta do risco envolvido.

Devido à fragilidade das populações de animais que habitam o continente antártico, alguns cuidados foram estabelecidos internacionalmente para sua preservação. O Comitê Especial para Pesquisas Antárticas somente libera a permissão de captura e manejo para retirada de amostras de 100 aves por expedição, sendo que a captura deve ser realizada fora dos sítios onde estão localizados os ninhos, visando interferências mínimas na reprodução das espécies envolvidas.

A metodologia de coleta permitiu, ainda assim, uma amostragem de um considerável número de aves, com a coleta de material de 283 pinguins pertencentes a quatro espécies diferentes. A escolha de localidades distintas proporcionou um equilíbrio numérico bastante razoável de três das espécies estudadas. Foram colhidas amostras de 91 pinguins - papua, 85 pinguins-antártico e 105 pinguins-adélia (32%, 30% e 37% respectivamente).

A exceção foi a captura de apenas dois exemplares de pinguins - rei, espécie esta que também tem sua área de vida circunscrita a região sub - antártica, sendo desta forma interessante para o desenvolvimento deste estudo. Este fato pode ser explicado pela distribuição dessa espécie. A região onde foi desenvolvido o estudo fica no limite norte da área de vida dos pinguins-rei, portanto raramente estas aves se deslocam até lá (Bost et al., 1997).

No trabalho de campo realizado, coletamos amostras traqueais e cloacais com a utilização de zaragatoas. Este tipo de amostragem é importante uma vez que o vírus da influenza tem sua replicação realizada nos tecidos traqueais e intestinais das aves podendo ser disperso no ambiente através de regurgito e fezes. As amostras traqueais geralmente são menos contaminadas favorecendo sempre a extração de RNA e o isolamento do vírus. Nas amostras cloacais pode-se esperar uma maior contaminação, no entanto são amostras que em aves portadoras do vírus da influenza apresentam uma carga viral muito maior.

Uma alíquota de sangue foi também coletada e seu soro retirado ainda em campo. O objetivo dessa coleta foi a identificação do contato das aves com o patógeno, caso os métodos moleculares aplicados nas amostras cloacais/traqueais não viessem a resultar na detecção do vírus. Através da sorologia poder-se-ia identificar quais os subtipos virais envolvidos no contágio com a utilização de técnicas de inibição de hemaglutinação. Os soros não foram utilizados para o presente trabalho.

Mesmo sem apresentarem qualquer sinal clínico de influenza, 8 dos 283 pinguins amostrados (2,8%) apresentaram resultados positivos comprovados pelos métodos de RT - PCR com leitura em gel de agarose e GeneScan através da detecção de um segmento de 192 pares de bases, bastante conservado nos vírus de influenza, encontrado no segmento 8 codificador das proteínas NS.

A confirmação foi realizada através do PCR em Tempo Real onde foram utilizados outros primers que permitiram a detecção de um segmento conservado de 106 pares de bases pertencente ao segmento 7 codificador das proteínas de matriz M1 e M2.

As espécies envolvidas nos achados foram o pinguim-adélia (*Pygoscelis adeliae*) e o pinguim-papua (*Pygoscelis papua*). Os três indivíduos do pinguim-adélia e cinco do pinguim-papua com amostras positivas para o vírus da influenza A foram coletados durante o verão antártico de 2006-2007 nas praias próximas a Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz.

Mais 35 amostras testadas pelo método da RT - PCR com leitura em gel de agarose apresentaram possíveis resultados positivos, porém exibindo bandas pouco nítidas, o que poderia estar ligado ao fato de uma baixa carga viral ter sido identificada. Esse fato obrigou a realização de uma nova bateria de testes para a confirmação.

Foram utilizados também para confirmação do vírus de influenza nestas amostras as técnicas de GeneScan e o PCR em Tempo Real. Kubista (2006) descreveu que com a tecnologia da PCR em Tempo Real, a eficiência dos reagentes utilizados na detecção, instrumentação bastante sensível e reações otimizadas, esta metodologia permite a detecção em uma amostra que contenha um número muito baixo de moléculas do material genético, apresentando uma acurácia sem precedentes. Mesmo com a utilização dessa técnica não pode ser evidenciada a presença do vírus nessas 35 amostras, sendo então consideradas negativas.

Interessante ressaltar que todas as amostras positivas foram coletadas durante o verão de 2006-2007. Nesta ocasião devido ao acesso que a equipe de campo obteve a um laboratório situado no Módulo de Química, a extração do material genético foi realizada nos tempos livres entre as coletas de campo. Já para as amostras dos verões de 2007-2008 e 2008-2009 esta estratégia não pode ser repetida por falta de condições na Ilha Elefante e por indisponibilidade de laboratórios na estação brasileira. As amostras coletadas nestes períodos foram então armazenadas em nitrogênio líquido e demoraram alguns meses para chegar ao Brasil para o seu processamento. Durante a viagem de navio o cilindro de nitrogênio ficou armazenado na câmara

fria e foi reabastecido pela tripulação quando necessário. A impossibilidade do transporte por via aérea e a logística complicada no armazenamento das amostras no navio podem ter sido um complicador para o sucesso na detecção do vírus da influenza, já que 35 amostras apresentaram algum sinal de banda no RT - PCR podendo significar uma baixa carga viral ou uma degradação do material genético contido.

Das 8 amostras positivas obtidas pelo método da RT - PCR quatro puderam ser sequenciadas e comparadas com sequências do vírus da influenza A.

O sequenciamento foi determinante para a constatação da presença do vírus de influenza A nas amostras de número 16/06, 21/06, 23/06 e 86/06. As amostras 42/06, 45/06, 50/06 e 77/06 apresentaram bandas geradas no gel de agarose mais fracas (dados não mostrados) evidenciando provavelmente uma menor carga viral. Esse fato possivelmente foi o causador da inviabilidade da realização do sequenciamento dessas amostras.

Quando as sequências produzidas foram alinhadas, algumas pequenas variações na posição dos nucleotídeos puderam ser percebidas. Conforme pode ser observado na figura 34, na posição 43 as amostras 21/06 e 86/06 apresentam uma citosina no lugar da timina das demais amostras e do controle. Na posição 59 a amostra 86/06 apresenta uma timina no lugar da citosina das demais amostras e controle positivo. Outra alteração constatada está presente na posição 112 onde se percebe uma substituição da guanina presente no controle positivo e nas outras amostras pela adenina nas amostras 21/06 e 86/06. Por último pode-se observar uma alteração na posição 149 onde se encontra uma adenina na amostra 86/06 no lugar da guanina das demais amostras e controle e na posição 153 onde na mesma amostra 86/06 uma adenina esta no lugar da citosina presente nas demais amostras e controle.

Todas as variações de nucleotídeos encontradas provavelmente foram resultados de mutações de transição com exceção da localizada na posição 153 na amostras 86/06 que apresenta uma mutação de transversão.

Com o alinhamento das sequências de nucleotídeos, pode-se obter uma identidade de 100% entre o controle H1N1 e as amostras número 16/06 (*P. adeliae*) e 23/06 (*P. papua*). Já as amostras 21/06 (*P. papua*) e 86/06 (*P. papua*) demonstraram uma identidade de 98,4% e 96,8% quando comparadas ao controle e as outras duas outras amostras. O controle positivo obteve uma identidade de 100% quando comparado com padrões de sequência do gene NS para influenza A do GenBank (192 pb).

As sequências obtidas também foram comparadas com padrões depositados no GenBank para o segmento 8 do vírus da influenza A. Para tal foi realizado primeiramente um alinhamento das sequências 16/06, 21/06, 23/06 e 86/06 com 465 sequências obtidas no banco de dados para todas as variantes recombinantes de HA e NA possíveis encontradas até o momento que tenham infectado aves, porcos, humanos, outros mamíferos ou que foram coletadas no meio ambiente.

Após as análises genealógicas, que foram realizadas empregando os critérios de distâncias evolutivas utilizando o programa MEGA 4.0, formou-se uma árvore de máxima verossimilhança (maximum likelihood) com as 469 sequências. As sequências que apresentaram uma menor similaridade foram retiradas até a formação da árvore demonstrada na Figura 37.

Apesar da região estudada de 192 pares de base ser altamente conservada para o todos os vírus da influenza A e estar inserida no segmento 8 que codifica as proteínas não estruturais NS1 e NS2, pode-se observar uma similaridade entre a sequência encontrada nos vírus de pinguins e sequências do GenBank de vírus que infectaram seres humanos. As sequências de vírus que infectaram aves e porcos não obtiveram uma grande similaridade quando comparadas com as amostras de pinguins sequenciadas em nosso estudo. Outro dado interessante diz respeito às sequências das amostras 16/06 e 23/06 que apresentam maior similaridade com amostras de vírus que acometeram humanos tipificadas como H1N1 e as amostras 21/06 e 86/06 tiveram maior similaridade com sequências de vírus em humanos tipificadas com H2N1 e H3N2.

Foi realizada a tentativa de isolamento de todas as amostras através da passagem em ovos embrionados de galinha. Com a exceção do cultivo da amostra 35, todas as outras 282 amostras cultivadas tiveram resultado negativo, tanto na primeira passagem quanto na segunda passagem em ovos embrionados. O teste de HA realizado para testar a atividade hemaglutinante dos fluidos do líquido alantóico para as 282 amostras cultivadas resultou na precipitação das hemácias. Somente na amostra 35 pertencente a um pinguim - papua coletado próximo ao módulo de química em 2006 pode-se constatar a aglutinação das hemácias de galinha.

Foi então realizado um teste rápido para a identificação do vírus da influenza nessa amostra, porém este resultou negativo. Cabe ressaltar que esta amostra foi considerada negativa para todos os testes moleculares realizados.

Desta forma não foi possível o isolamento do vírus da influenza do tipo A nas 283 amostras de pinguins antárticos. Outros autores já haviam descrito a dificuldade de se isolar cepas

virais de amostras clínicas de aves adultas e saudáveis, especialmente as linhagens de baixa virulência (Sakai, 2006).

Merece atenção o ineditismo do nosso achado, pois até o momento a comprovação da existência da circulação de vírus da influenza A nas populações de aves na Antártica foi efetivada apenas por de dados sorológicos.

Morgan e Westbury (1981) coletaram amostras de sangue e cloaca de 285 pinguins-adélia nas proximidades da Estação Francesa Dumont d'Urville. Foram realizados testes de HA e tentativa de isolamento do vírus da influenza A em ovos embrionados. Das 285 amostras coletadas somente seis (2%) apresentaram anticorpos para H7, não tendo sido obtido o isolamento do vírus.

Em um estudo realizado por Austin e Webster (1993) na ilha de Ross foram amostrados 91 pinguins-adélia e 60 skuas (*Stercorarius maccormicki*). Nesses estudos a presença de anticorpos para H 10 em pinguins-adélia foi de 26,3% e em skua foi de aproximadamente 6%.

Recentemente Wallensten et al (2006b) coletaram 76 amostras e sangue dos pinguins-papua nas ilhas Geórgia do Sul e Ilha dos Pássaros além de 29 amostras de fezes de pinguins-antártico, 30 de pinguins-adélia e 131 de pinguins-papua. Das amostras de sangue testadas 9 (11,8%) obtiveram resultados positivos para sorologia de influenza A. As amostras de fezes foram testadas através da utilização da RT – PCR , todas com resultado negativo.

A quantidade de 8 amostras positivas, num total de 283 amostras testadas encontradas no nosso estudo não pode ser considerada um número baixo. Um trabalho de monitoramento de vírus da influenza em aves na grande maioria aquáticas, incluindo pinguins-de-magalhães, realizado na Patagônia Argentina mostra resultados onde o percentual de amostras positivas é de 0,41%. De um total de 2865 amostras testadas, os autores conseguiram através de métodos moleculares 12 amostras positivas, desse total apenas 1 foi isolada em ovos embrionados (Pereda et al., 2008). Apesar da existência comprovada do vírus da influenza em aves silvestres, principalmente de hábitos aquáticos, na America, a prevalência entre os indivíduos de uma mesma comunidade parece ser baixa.

Uma possível explicação para uma maior prevalência da circulação dos vírus em pinguins antárticos poderia estar ligada aos hábitos dessas aves que formam colônias podendo exceder 100 mil casais na época de procriação. Essa característica é bastante peculiar para as espécies de pinguins antárticos, sendo que as colônias de espécies subtropicais têm geralmente um número

menor de casais. O contato constante entre os indivíduos durante a procriação, a disputa por espaço e a proteção dos filhotes, podem estar favorecendo a transmissão do vírus.

A constatação da presença do vírus da influenza A em pinguins na Antártica nos faz pensar como ocorre a circulação deste vírus pelas populações de aves e mamíferos aquáticos que ali habitam e nos visitantes deste continente, como é o caso do homem.

A Antártica não é um continente tão remoto em relação a circulação de patógenos como pode parecer a primeira vista. Algumas espécies de aves que ali vivem são migratórias alcançando as zonas temperadas do planeta durante o inverno antártico, como é o caso dos procelariídeos, larídeos e phalacrocoracídeos. O maior migrante para região antártica que se tem notícia é a andorinha-do-ártico (*Sterna paradiseae*) que nidifica na região do ártico e passa a estação não reprodutiva na região antártica. Estudos realizados com algumas destas espécies comprovam a circulação do vírus da influenza A (Sinnecker et al., 1983).

O contato destas aves migratórias como os petréis, albatrozes, gaivotas e *skuas* com os pinguins se dá principalmente durante a época reprodutiva quando é possível encontrar tais espécies nidificando perto de colônias de pinguins. Neste período é frequentemente observada também a visita de *skuas* e gaivotas nas pinguineiras, agindo como predadores oportunistas dos ovos e filhotes de pinguins.

Outro fator importante que deve ser considerado na disseminação de patógenos na região Antártica é a expansão da atividade humana, tanto turística quanto científica.

Embora a Antártica não tenha populações humanas residindo permanentemente, alguns governos mantêm estações de pesquisa instaladas por todo o continente. A população de cientistas no continente e nas ilhas subantárticas varia de aproximadamente quatro mil pessoas no verão a mil no inverno. Muitas das estações de pesquisa mantêm pessoal durante todo o ano.

Apesar do turismo na Antártica ser ainda muito caro, devido a infra-estrutura necessária, nos últimos anos várias agências de turismo se aventuram na região antártica. No momento mais de 10 países diferentes possuem agências atuando na Antártica com navios de turismo. As visitas se concentram nas zonas livres de gelo nos meses entre novembro e março. Os visitantes fazem curtas incursões nas regiões costeiras, visitando estações científicas, monumentos históricos e principalmente as colônias de animais. São explorados ao todo mais de 150 sítios, incluindo 20 estações científicas, nos roteiros das visitas. Alguns sítios recebem até 7000 visitantes

anualmente. Na década de 80 o número de turistas que frequentava a Antártica não passava de 1000, porém com a recente expansão do turismo atualmente passam dos 45000.

Dessa forma a disseminação do vírus da influenza poderia se dar em dois sentidos. As pessoas podem atuar como vetores, tanto trazendo novas variantes do vírus exóticas para a região como translocando variantes endógenas. Além disso, o estresse causado pela atividade humana crescente pode reduzir a imunidade dos pinguins e outras aves que ali habitam, aumentando a patogenicidade do vírus e a susceptibilidade das aves para a infecção.

Os estudos do vírus de influenza em pinguins antárticos ainda são escassos, mas já demonstram claramente a circulação do vírus nessas populações de aves, tanto através de dados sorológicos quanto por meio da detecção através de metodologia molecular. Porém, pouco é conhecido a respeito da patogenicidade desses vírus, de qual o papel na mortalidade dos pinguins antárticos, quais outras espécies podem estar envolvidas em sua transmissão ou ainda se é possível os pinguins transmitirem as variantes que aí circulam para outras espécies animais ou até para o homem.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos podemos concluir:

1 – Que a metodologia de coleta e de análise empregada foi adequada, uma vez que foi detectado o vírus de Influenza A pela primeira vez em pinguins na Antártica. As técnicas moleculares, em especial o RT – PCR, mostraram-se bastante sensíveis mesmo com baixa carga viral. As técnicas de Gene Scan e PCR em Tempo Real mostraram-se tão eficientes quanto a da RT - PCR, servindo para comprovar os resultados desta última.

2 - Que existe influenza aviária na Antártica, provavelmente de baixa patogenicidade ou coevoluida com as aves que habitam este continente. Devido a isto a vigilância epidemiológica deve ser realizada continuamente com a finalidade de detectar possíveis focos futuros, principalmente de vírus de alta patogenicidade.

3 – Que as espécies de aves migratórias que frequentam o continente antártico e entram em contato com aves residentes devem ser constantemente monitoradas para conhecimento da disseminação de variantes virais deste continente para as zonas temperadas e tropicais do planeta e vice versa.

4 – Que com o aumento do contato de seres humanos com animais residentes no continente antártico e região subantártica (devido ao aumento das estações de pesquisa e turismo), linhas de pesquisa devem ser implementadas para o monitoramento das variantes do vírus da influenza, que possam ser carregadas pelo homem a este continente bem como as variantes circulantes nos animais antárticos que possam afetar o ser humano e se dispersar pelo resto do planeta..

REFERÊNCIAS*

Alexander DJ. A review of avian influenza in different bird species Vet. Microbiol. 2000;74(1/2):3-13.

Austin FJ, Webster RG. Evidence of Ortho- and Paramyxoviruses in fauna from Antarctica. Journal of Wildlife Disease. 1993;29(4):368-371.

Berchieri Jr A, Macari M. Doenças das Aves. Campinas: FACTA - Fundação APINCO de Ciências e Tecnologia Avícolas; 2000.

Besselaar TG, Botha L, McAnerney JM, Schoub BD. Antigenic and molecular analysis of influenza A (H3N2) virus strains isolated from a localised influenza outbreak in South Africa in 2003. J Med Virol. 2004;73(1):71-78.

Boere GC, Stroud DA. The flyway concept: what it is and what it isn't. In: Boere GC, Galbraith CA, Stroud DA, editors. Waterbirds around the world. Edinburgh, UK: The Stationary Office; 2006. p. 40-47. Disponível em: http://www.jncc.gov.uk/PDF/pub07_waterbirds_part1_flywayconcept.pdf [2008 Out 29].

Bost CA, Georges JY, Guinet C, Cherel Y, Pütz K, Charrassin J B, Handrich Y, Zorn T, Lage J, Maho Y. Foraging habitat and food intake of satellite-tracked king penguins during the austral summer at Crozet Archipelago Marine Ecology Process Series. 1997;150:21-33.

Braakman I, Anken E. Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum, Traffic. 2000;1:533-539.

Bridges CB, Kuehnert MJ, Hall CB. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. Clin Infect Dis. 2003;37(8):1094-1101.

Brown EG. Influenza virus genetics. Biomed Pharmacother. 2000;54(4):196-209.

Büchen-Osmomd C. Orthomyxoviridae. In: _____. ICTVdB – The universal Virus Database, version 3. ICTVdB Management. New York, USA: Columbia University; 2003.

Calisher CH. Swine Flu. Croat Med J. 2009;50(4):412-415.

Capua I, Alexander DJ. Avian influenza and human health. Acta Tro. 2002;83(1):1-6.

Capua I, Alexander DJ. Avian influenza: recent developments. Avian Pathol. 2004;43:393-404.

Choi YK; Goyal SM; Kang SW; Farnham MW; Joo HS. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. J Virol. 2002;76:53-59.

* De acordo com : International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Claas ECJ, Sprenger MJW, Kleter GEM, VanBeeek R, Quint WGV, Masurel N. Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods*. 1992;39:1-13.

Cherian T, Bobo L, Steinhoff MC, Karron RA, Yolken RH. Use of PCR-enzyme immunoassay for identification of influenza A virus matrix RNA in clinical samples negative for cultivable virus. *J Clin Microbiol*. 1994;32:623-628.

Cox NJ, Subbarao K. Global epidemiology of influenza: past and present. *Annu Rev Med*. 2000;51:407-421.

Ellis JS, Fleming DM, Zambon MC. Multiplex reverse transcription-PCR for surveillance of influenza A and B viruses in England and Wales in 1995 and 1996. *J Clin Microbiol*. 1997;35:2076-2082.

Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 1985;39:783-791

Fouchier RA, Munster V, Wallensten A, Bestebroer TM, Herfst S, Smith D, Rimmelzwaan GF, Olsen B, Osterhaus ADME. Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from Black-headed gulls. *J Virol*. 2005;79(5):2814-2822.

Gammel M, Altmüller A, Reinhardt U, Mandler J, Harley VR, Hudson PJ, et al. Phylogenetic analysis of nucleoproteins suggests that human influenza A viruses emerged from a 19th-century avian ancestor. *Mol Biol Evol*. 1990;7(1):194-200.

Geraci JR, St. Aubin DJ, Barker IK, Webster RG, Hinshaw VS, Bean WJ, Ruhnke HL, Prescott JH, Early G, Baker AS, Madoff S, Schooley RT. Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*. 1982;215(4):1129-1131

Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Immunology*. 4th ed. New York, USA: W.H. Freeman and Company; 2000. 670 p.

Gorman OT, Bean WJ, Kawaoka Y, Webster RG. Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol*. 1990;64(1):1487-97.

Harmon MW. Influenza viruses. In: Lenette EH, editor. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker; 1992. p. 515-534.

Hay AJ. The virus genome and replication. In: Nicholson KG, Webster RG and Hay AJ, editors. *Textbook of influenza*. London: Blackwell Science; 1998. p. 43-53.

Herrmann B, Larsson C, Zwegberg BW. Simultaneous Detection and Typing of Influenza Viruses A and B by a Nested Reverse Transcription-PCR: Comparison to Virus Isolation and Antigen Detection by Immunofluorescence and Optical Immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol*. 2001;39:134-138.

Hilleman MR. "Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. Vaccine. 2002;20:3068-3087.

Hinshaw VS, Bean WJ, Geraci JR, Fiorelli P, Early P, Webster RG . Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. J Virol. 1986;58:655-656.

Honda A, Endo A, Mizumoto K, Ishihama A. Differential roles of viral RNA and cRNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase. J Bio. Chem.2001;276(33): 31179-31185.

Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y, Webster RG. Origin and molecular changes associated with emergence of a highly pathogenic H5N2 influenza virus in Mexico. Virology. 1995;213:223-230

Hunford R. O último lugar da Terra: a competição entre Scott e Amundsen pela conquista do Pólo Sul. São Paulo: Companhia das Letras; 2002.

Izaguirre I, Mataloni G. Antártida, descubriendo el Continente Blanco. S.C. Bariloche, Espana: Ediciones Caleuche; 2000. 24 p.

Kaiser J. A one size fits all flu vaccine. Science. 2006;312:380-382.

Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K et al. Review: The real-time polymerase chain reaction. Mol Aspec Med. 2006;27:95–125.

Klumpp K, Ruigrok RW, Baudin F. Roles of the influenza vírus polymerase and nucleoprotein in forming a funcional RNA structure. EMBO J. 1997;16(6):1248-1257.

Kuszewski K, Brydak L. The epidemiology and history of influenza. Biomed Pharmacother. 2000;54(4):188-195.

Laver G, Garman E. Pandemic Influenza: its origin and control. Microbes infect. 2002;4(13): 1309-1316.

Mackay IM, Arden KE, Nitshe A, Real-time PCR in virology. Oxford University Press. 2002;30(6):1292-1305.

Mena I, Jambrina E, Albo C, Perales B, Ortin J, Arrese M, Vallejo D, Portela A. Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: isentification of mutations that affect RNA replications. J Virol. 1999;73(2):1186-1194

Morgan IR, Westbury HA. Virological studies of Adelie Penguins (Pygoscelis adeliae) in Antarctica. Avian Dis. 1981;25(4):1019-26.

Morgan IR, Westbury HA. Studies of viruses in penguins in the Vestfold Hills. Hydrobiologia. 1988;165:263-269.

Mould JA, Li HC, Dudlak CS, Lear JD, Pekosz A, Lamb RA, Pinto LH. Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza A virus. *J Biol Chem*. 2000;275(12):8592-8599.

Murphy BR, Webster RG. Orthomyxovirus. In: Fields BN, Knipe DM, editors. *Virology*. 2nd ed. New York: Raven Press; 2001.

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. *J Virol*. 1996;70(9): 6390-6394.

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*. 2000;274:220-231.

NCBI ([2010]). [homepage on the Internet]. Scheme of Influenza A virus replication. Modificada de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/GenomesHome> [2006 jun08].

National Geographic Society ([2010]). [homepage on the Internet]. Canada. Modificada de <http://ngm.nationalgeographic.com/ngm/antarctica/index.html> [2008 jun].

Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 2006;312:384-388.

Pereda AJ, Uhart M, Perez A, Zaccagnini ME, Sala LL, Decarre J, Goijman A, Solari L, Suarez R, Craig MI, Vagnozzi A, Rimondi A, König G, Terrera MV, Kaloghlian A, Song H, Sorrell EM, Perez DR. Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: Evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology*. 2008;378:363-370.

Poddar SK. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. *J Virol Methods*. 2002;99:63-70.

Pontoriero AV, Baumeister EG, Campos AM, Savy VL, Lin YP, Hay A. Antigenic and genomic relation between human influenza viruses that circulated in Argentina in the period 1995-1999 and the corresponding vaccine components. *J Clin Virol*. 2003;28(2):130-140.

Potter CW. A history of influenza. *J Appl Microbiol*. 2001;91(4):572-579.

Programa GoogleEarthTM ([2010]). [homepage on the Internet]. Imagem de satélite mostrando a localização da Estação Brasileira Comandante Ferraz, na Ilha Rei George,. Disponível em <http://www.google.com/earth/index.html> [2007 dez].

Programa GoogleEarthTM [homepage on the Internet]. Imagem de satélite mostrando a localização da Ilha Elefante . Disponível em <http://www.google.com/earth/index.html> [2007 dez].

Reina J, Munar M, Blanco I. Evaluation of a direct immunofluorescence assay, dot-blot enzyme immunoassay, and Shell vial culture in diagnosis of lower respiratory tract infections caused by influenza A virus. *Diag Microbiol Infect Dis*. 1996;25:143-145.

Sakai K, Yada K, Sakabe G, Tani O, Miyaji K, Nakamura M et al. Serological and Virological Studies of Newcastle Disease and Avian Influenza in Slaughter-Age Ostriches (*Struthio camelus*) in Japan. *J Vet Med Sci*. 2006;68(5):491-494.

Sinnecker R, Sinnecker H, Zilske E, e Kphler D. Surveillance of pelagic birds for influenza A viruses. *Acta virologica*. 1983;27:75-79

Soares PB, Demetrio C, Sanfilippo L., Kawanoto AH, Brentano L, Durigon EL. "Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. *J Virol Methods*. 2005;123(2):125-130.

Scientific Committee on Antarctic Research (SCAR) [homepage on the internet]. Available from: <http://www.scar.org/treaty/> [2008 Dec 20].

Scholtissek C, Burger H, Bachmann PA, Hannoun C. Genetic relatedness of hemagglutinins of the H1 subtype of influenza A viruses isolated from swine and birds. *Virology*. 1983;129:521-523

Skehel JJ, Wiley DC. Influenza Haemagglutinin.Vaccine. 2002;20(2):51-54.

Smith FB. The Russian Influenza in the United Kingdom, 1889-1894.Social History of Medicine.1995;(8):55-73.

Stockton J, Ellis JS, Saville M, Clewley JP, Zambon MC. Multiplex PCR for typing and subtyping influenza and respiratory syncytial viruses. *J Clin Microbiol*. 1998;36(10):2990-2925.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. *MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0*. *Molecular Biology and Evolution*.2007;24:1596-1599.

Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA, Fanning TG. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001;336(1416):1829-1839.

The Center for Food Security & Public Health High Pathogenicity Avian Influenza.2010. Disponívelm:[http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/highly_pathogenic_avian_influenza.p](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/highly_pathogenic_avian_influenza.pdf)df. [2010 Set 26]

Van der Vries E, Jonges M, Herfst S, Maaskant J, Van der Linden A, Guldemeester J, Aron GI, Bestebroer TM, Koopmans M, Meijer A, Fouchier RA, Osterhaus AD, Boucher CA, Schutten M. Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. *J Clin Virol*. 2010;47(1):34-7.

Wallensten A, Munster VJ, Karlsson M, Lundkvist A, Brytting M, Stervander M, et al. High prevalence of influenza A virus in ducks caught during spring migration through Sweden. *Vaccine*. 2006;24(44-46):6734-5.

Wallensten A, Munster V, Osterhaus AD, Waldenström J, Bonnedahl J, Broman T, et al. Mounting evidence for the presence of influenza A virus in the avifauna of the Antarctic region. *Antartic Sci*. 2006;18:353-6. doi:10.1017/S095410200600040X.

Webster RG. Influenza: An emerging disease. *Emerging Infectious Disease*. 1998;4:436-441.

Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992;56(1):152-179.

Wikipedia([2010]). Mapa da Ilha Elefante[homepage on the Internet]. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/Ilha_Elefante [2010 set 01].

Wikipedia([2010]). Mapa da Ilha Rei George[homepage on the Internet]. Disponível em http://pt.wikipedia.org/wiki/Ilha_Rei_George [2010 set 01].

Williams TD. Bird families of the world. The penguins. New York: Oxford University Press; 1995. 295 p.

Wright KE, Wilson GA, Novosad D, Kimock C, Tan D, Weber JM. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. *J Clin Microbiol*. 1995;33(5):1180-1184.

Yewdell J, Garcia-Sastre A. Influenza virus still surprises. *Cur Opin Microbiol*. 2002(5): 414-418.

Zambon MC. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J Antimicrob Chemother* 1999;44(pt. B):3-9.

APÊNDICE A - Tabela do resultado do total de amostras testadas pelo método de PCR com visualização em gel de agarose, PCR em Tempo Real, GeneScan e confirmadas por sequenciamento.

(continua)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
1.	01/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	20/11/2006	Módulo de Química	Neg.
2.	02/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	20/11/2006	Módulo de Química	Neg.
3.	03/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	20/11/2006	Refúgio 1	Neg.
4.	04/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	20/11/2006	Refúgio 1	Neg.
5.	05/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	20/11/2006	Punta Plaza	Neg.
6.	06/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	20/11/2006	Punta Plaza	Neg.
7.	07/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	20/11/2006	Punta Plaza	Neg.
8.	08/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	20/11/2006	Punta Plaza	Neg.
9.	09/06	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	20/11/2006	Punta Plaza	Neg.
10.	10/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	20/11/2006	Punta Plaza	Neg.
11.	11/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
12.	12/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
13.	13/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
14.	14/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
15.	15/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
16.	16/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Pos.
17.	17/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
18.	18/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
19.	19/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
20.	20/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
21.	21/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Pos.
22.	22/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
23.	23/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Pos.
24.	24/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
25.	25/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
26.	26/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
27.	27/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
28.	28/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
29.	29/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
30.	30/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Refúgio 1	Neg.
31.	31/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
32.	32/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
33.	33/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
34.	34/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	21/11/2006	Módulo de Química	Neg.
35.	35/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
36.	36/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
37.	37/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
38.	38/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
39.	39/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
40.	40/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
41.	41/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
42.	42/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Pos.
43.	43/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	23/11/2006	Punta Hennequin	Neg.
44.	44/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Neg.
45.	45/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Pos.
46.	46/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Neg.
47.	47/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Neg.
48.	48/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
49.	49/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Módulo de Química	Neg.
50.	50/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Pos.
51.	51/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
52.	52/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
53.	53/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
54.	54/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
55.	55/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
56.	56/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
57.	57/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
58.	58/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
59.	59/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
60.	60/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	27/11/2006	Refúgio 1	Neg.
61.	61/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
62.	62/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
63.	63/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	29/11/2006	Módulo de Química	Neg.
64.	64/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
65.	65/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
66.	66/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
67.	67/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
68.	68/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
69.	69/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
70.	70/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
71.	71/06	<i>pinguim-antártico</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.
72.	72/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	29/11/2006	Refúgio 1	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
73.	73/06	<i>pinguim-antártico</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
74.	74/06	<i>pinguim-antártico</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
75.	75/06	<i>pinguim-antártico</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
76.	76/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
77.	77/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Pos.
78.	78/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
79.	79/06	<i>pinguim-antártico</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
80.	80/06	<i>pinguim-antártico</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
81.	81/06	<i>pinguim-antártico</i>	<i>Pygoscelis antarctica</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
82.	82/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
83.	83/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
84.	84/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
85.	85/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
86.	86/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	30/11/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Pos.
87.	87/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
88.	88/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
89.	89/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
90.	90/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
91.	91/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
92.	92/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
93.	93/06	<i>pinguim-adélia</i>	<i>Pygoscelis adeliae</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
94.	94/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
95.	95/06	<i>pinguim-papua</i>	<i>Pygoscelis papua</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
96.	96/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	01/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
97.	97/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
98.	98/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
99.	99/06	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
100.	100/06	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	06/12/2006	Entre Punta Plaza e o Módulo de Química	Neg.
101.	01/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
102.	02/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
103.	03/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
104.	04/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
105.	05/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
106.	06/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
107.	07/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
108.	08/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
109.	09/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
110.	10/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
111.	11/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
112.	12/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
113.	13/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
114.	14/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
115.	15/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
116.	16/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
117.	17/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
118.	18/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
119.	19/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
120.	20/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
121.	21/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
122.	22/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
123.	23/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
124.	24/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
125.	25/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
126.	26/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
127.	27/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
128.	28/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
129.	29/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
130.	30/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
131.	31/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
132.	32/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
133.	33/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
134.	34/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
135.	35/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
136.	36/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
137.	37/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
138.	38/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
139.	39/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
140.	40/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
141.	41/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
142.	42/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
143.	43/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
144.	44/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
145.	45/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
146.	46/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
147.	47/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
148.	48/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
149.	49/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
150.	50/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
151.	51/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
152.	52/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
153.	53/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
154.	54/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
155.	55/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
156.	56/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
157.	57/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
158.	58/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
159.	59/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
160.	60/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	05/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
161.	61/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
162.	62/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
163.	63/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
164.	64/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
165.	65/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
166.	66/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
167.	67/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
168.	68/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
169.	69/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
170.	70/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
171.	71/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
172.	72/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
173.	73/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
174.	74/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
175.	75/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
176.	76/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
177.	77/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
178.	78/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
179.	79/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
180.	80/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
181.	81/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
182.	82/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
183.	83/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
184.	84/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
185.	85/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
186.	86/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
187.	87/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
188.	88/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
189.	89/07	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
190.	90/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
191.	91/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
192.	92/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
193.	93/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
194.	94/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
195.	95/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
196.	96/07	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg.
197.	97/07	pinguim-rei	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Neg
198.	98/07	pinguim-rei	<i>Aptenodytes patagonicus</i>	08/12/2007	Ilha Elefante/Antártica	Negr
199.	01/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
200.	02/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
201.	03/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
202.	04/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
203.	05/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
204.	06/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
205.	07/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
206.	08/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
207.	09/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
208.	10/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
209.	11/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
210.	12/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg
211.	13/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
212.	14/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
213.	15/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	03/12/2008	Frente EACF	Neg.
214.	16/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
215.	17/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
216.	18/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
217.	19/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
218.	20/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
219.	21/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
220.	22/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
221.	23/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
222.	24/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
223.	25/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	04/12/2008	Frente EACF	Neg.
224.	26/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg
225.	27/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg
226.	28/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
227.	29/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
228.	30/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
229.	31/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
230.	32/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
231.	33/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
232.	34/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
233.	35/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	05/12/2008	Punta Plaza	Neg.
234.	36/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
235.	37/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
236.	38/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
237.	39/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
238.	40/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.

(continuação)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
239.	41/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
240.	42/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
241.	43/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
242.	44/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
243.	45/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
244.	46/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
245.	47/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
246.	48/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	06/12/2008	Frente EACF	Neg.
247.	49/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	09/12/2008	Frente EACF	Neg.
248.	50/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	09/12/2008	Frente EACF	Neg.
249.	51/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	09/12/2008	Frente EACF	Neg.
250.	52/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	09/12/2008	Frente EACF	Neg.
251.	53/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	09/12/2008	Frente EACF	Neg.
252.	54/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	09/12/2008	Frente EACF	Neg.
253.	55/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	10/12/2008	Frente EACF	Neg.
254.	56/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	10/12/2008	Frente EACF	Neg.
255.	57/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	10/12/2008	Frente EACF	Neg.
256.	58/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	10/12/2008	Frente EACF	Neg.
257.	59/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	10/12/2008	Frente EACF	Neg.
258.	60/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	10/12/2008	Frente EACF	Neg.
259.	61/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg.
260.	62/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg.
261.	63/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg.
262.	64/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg.

(conclusão)

Número de amostras	Identificação da Amostra	Nome popular	Nome científico	Data da coleta	Local	Resultados
263.	65/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg
264.	66/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg.
265.	67/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg.
266.	68/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	11/12/2008	Frente EACF	Neg.
267.	69/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	12/12/2008	Punta Plaza	Neg.
268.	70/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	12/12/2008	Punta Plaza	Neg.
269.	71/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	12/12/2008	Punta Plaza	Neg.
270.	72/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	12/12/2008	Punta Plaza	Neg
271.	73/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	12/12/2008	Punta Plaza	Neg.
272.	74/08	pinguim-adélia	<i>Pygoscelis adeliae</i>	12/12/2008	Punta Plaza	Neg.
273.	75/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	09/03/2009	Punta Plaza-Ipanema	Neg.
274.	76/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	09/03/2009	Punta Plaza-Ipanema	Neg.
275.	77/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	09/03/2009	Punta Plaza-Refúgio 1	Neg.
276.	78/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	09/03/2009	Punta Plaza-Refúgio 1	Neg.
277.	79/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	09/03/2009	Punta Plaza-Refúgio 1	Neg.
278.	80/08	pinguim-antártico	<i>Pygoscelis antarctica</i>	09/03/2009	Punta Plaza-Refúgio 1	Neg.
279.	143/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	16/03/2009	Módulo de Química	Neg.
280.	145/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	17/03/2009	Módulo de Química	Neg.
281.	146/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	17/03/2009	Módulo de Química	Neg.
282.	147/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	17/03/2009	Módulo de Química	Neg.
283.	149/08	pinguim-papua	<i>Pygoscelis papua</i>	17/03/2009	Módulo de Química	Neg.