

MARINA MARIA MORAES DE SEIXAS

**Estudo do vírus Influenza em aves marinhas
da região subantártica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

MARINA MARIA MORAES DE SEIXAS

**Estudo do vírus Influenza em aves marinhas
da região subantártica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2014

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

reprodução não autorizada pelo autor

Seixas, Marina Maria Moraes de.

Estudo do vírus influenza em aves marinhas da região subantártica /
Marina Maria Moraes de Seixas. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de
concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Virologia clínica e
molecular.

Versão do título para o inglês: Study of influenza virus in seabirds of
sub-antarctic region.

1. Vírus de RNA 2. Virologia veterinária 3. Biologia molecular 4.
Anticorpo 5. Saúde animal I. Durigon, Prof. Dr. Edison Luiz II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0146/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marina Maria Moraes de Seixas.

Título da Dissertação: Estudo do vírus influenza em aves marinhas da região subantártica.

Orientador(a): Profº Dr. Edison Luiz Durigon.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

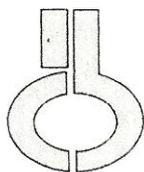
Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **133** nas fls. **135** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Edison Luiz Durigon**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Estudo do vírus influenza, pelo método de Real Time RT-PCR, em aves marinhas da região Antártica*" do qual participam o(s) aluno(s), **Marina Maria Moraes de Seixas, Tatiane Lopes Ometto Renata Hurtado, Jansen de Araújo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **19.10.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 19 de outubro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À todas as aves da Antártica

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Vera e Délio, por terem sempre respeitado as minhas escolhas e decisões com muito apoio e excelentes palavras. À minha amiga e irmã Martha, companheira de princípios e de vida, e aos irmãos Heloísa e Horácio que, apesar da distância física, me estimularam com seus exemplos, palavras e carinho. À minha prima Valda, minha mãe paulista, companheira de alegria, vinhos e aflições. Aos meus cunhados, tios, primos e familiares, para os quais sou uma eterna estudante aventureira dedicada! Vocês todos fazem qualquer obstáculo parecer fácil e tranquilo!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Edison Luiz Durigon, principalmente pelas incríveis oportunidades concedidas, pela confiança e aprendizado, e por ter me estimulado a ser corajosa e persistente.

Ao Sr. David Walker, do *St. Jude Children's Research Hospital*, pelas tentativas de isolamento viral; e aos Srs. Ricardo Dalla Costa, Eduardo Castan e Sra. Beatriz Pinto, da empresa *Life Technologies*, pelo sequenciamento de nova geração, e ao Dr. Jansen de Araújo, também pelas análises filogenéticas.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB, na USP: Angélica Campos, Camila Seabra, Danielle Bruna, Danielle Araújo, Danila Vedovello, Erika Donizetti, Gustavo Góes, Priscila Macedo, Raquel Negrão, Thaís Colmanetti, Zé Maria e, em especial, à minha equipe: Carla Meneguim, Luciano Thomazelli, Jansen de Araújo, Renata Hurtado e Tatiana Ometto, pela dedicação profissional, superações durante o trabalho de campo, e amizade compartilhada. Não há palavras para agradecer o quanto aprendi com todos vocês!!

À Profa. Dra. Maria Virgínia Petry, por ter confiado no meu profissionalismo durante todas as expedições à Antártica.

Aos colegas da UNISINOS: Camila Marchetto, Elisa Petersen, Priscila Kiscporski, Tatiana Zummach, e, em especial à Aparecida Basler, Gabriel Vier, Julia Foaie, Liana Chesin, Lucas Kruger e Roberta Piuco. Agradeço também à Bia Marques, Fernanda Colabuono, Luiz Eduardo Consiglio, Renato Dias e Ricardo Leizer. Pessoas com as quais dividi os momentos mais inesquecíveis da minha vida, na Antártica. Agradeço a compreensão, a seriedade e a amizade!

À Marinha do Brasil e à Força Aérea Brasileira, pelo suporte logístico concedido em todas as expedições à Antártica.

Às Profas. da UFF, Cathia Serra e Virginia Léo, por terem estimulado minhas expectativas profissionais, pela gentileza e entusiasmo desde antes do mestrado.

À Universidade de São Paulo (USP), por todo o aprendizado, suporte e estrutura. À todos os funcionários desta universidade, terceirizados ou não, os quais me ajudaram direta ou indiretamente nesses quase cinco anos de convivência e, em especial, à Gisele Santana, da secretaria da pós-graduação, e à Mônica Amaral, da biblioteca do ICB, pela paciência e agilidade.

Agradeço aos membros da banca, pela dedicação à leitura da dissertação, bem como, pelas contribuições importantes e discussões necessárias.

Pelos auxílios financeiros, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), e, principalmente à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), esta última pela concessão da bolsa de mestrado (2012/14255-8).

Ao meu amigo e companheiro, Eduardo Moreno, pela nossa persistência, lealdade e carinho, e por fazer de tudo algo único e especial.

À amiga, Renata Hurtado, pelas ótimas risadas, pelo estímulo pessoal e profissional, e pela dedicação especial.

Àquela que tenho o privilégio de conhecer, Erika Berenguer, pela amizade mais incondicional que conheço, e por acreditar tanto em mim.

Ao amigo Ralph Vanstreels, pelas boas conversas e excelentes mapas

Aos amigos: Marcello Nardi, Roberta Marcatti, Thiago Muniz e Daniela Aires, que continuam estimulando o meu caminho profissional e pessoal; à Nathalia Puttini, pelos suportes emocional e estrutural essenciais; aos amigos André Amaral, André Medeiros, Daniela Diogo, Neusa Amboni e Vivian Gandelsman, pela amizade interestadual, que facilitou muito minha adaptação nessa grande cidade.

Às amigas que conquistei e que me conquistaram em São Paulo: Bia Marins, Camila Torres, Cícero Alves, Erika Donizetti, Felipe Veiga, Letícia Vasconcellos, Maíra Freire, Valdir Blasios e Victor Pimentel, pela diversão e conversas, bebidas e excelentes momentos juntos!

Aos conhecidos, colegas e amigos, que fizeram parte de alguma forma no meu amadurecimento profissional ou pessoal, e, conseqüentemente, na evolução deste trabalho.

Às queridas amigas caninas, Lara e Mila, pela alegria da presença, e a companhia nos estudos. E, por fim, às aves, todas elas.

*"Escolhemos os riscos que vamos correr,
aceitando apenas os que podemos calcular.
A vida de ninguém depende de nosso sucesso -
exceto as nossas próprias."*

Ernest Shackleton

"É apenas em condições extremas que você começa a dar valor à vida"

Tripulante do Endurance

RESUMO

SEIXAS, M. M. M. **Estudo do vírus Influenza em aves marinhas da região subantártica**. 2014. 111 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Os vírus da influenza (IA) têm provocado epidemias e pandemias gripais em seres humanos, e também são capazes de causar debilidade e mortalidade em outras espécies. As aves silvestres são consideradas os reservatórios naturais dos vírus A, dentre essas, as espécies migratórias podem ter um importante papel como agentes transmissores na disseminação de doenças. A região antártica abriga enormes populações de aves marinhas, que reproduzem-se durante o verão austral formando colônias com milhares de indivíduos. O aumento da atividade humana e consequente risco de introdução de doenças na vida selvagem em locais inóspitos, como a Antártica, potencializam a importância do estudo da epidemiologia do vírus IA em aves marinhas, migratórias e residentes neste ambiente. Portanto, o objetivo deste estudo foi conhecer a ecologia dos vírus IA no ambiente antártico, por meio de testes sorológicos e biomoleculares efetuados em material biológico proveniente de aves marinhas capturadas na região subantártica. Entre 2010 e 2013 foram coletadas amostras biológicas de aves marinhas em três expedições científicas realizadas nas ilhas Elefante e Rei George. Das 585 aves amostradas com coleta de *swab* orotraqueal e cloacal, 13 indivíduos foram positivos pelo método de *One Step Real Time RT-PCR*, das espécies *Pygoscelis antarcticus* (pinguim-antártico) e *Catharacta lonnbergi* (skua-subantártica). Desta última foi proveniente a amostra caracterizada como sendo do tipo H6N8, similar a um subtipo isolado anteriormente na Argentina. Das 673 aves amostradas com coleta de soro, 108 foram positivas por Ensaio Imunoenzimático competitivo (cELISA), das mesmas espécies positivas pela técnica molecular, além de *P. adeliae* (pinguim-de-Adelie). Os resultados demonstram a circulação do vírus IA no ambiente subantártico, e de uma possível via de introdução no continente, através da Argentina. Este estudo contribuiu com o conhecimento do vírus IA na Antártica e recomenda medidas de prevenção tanto à saúde humana, quanto animal na Antártica.

Palavras-chave: Influenza. Antártica. Aves marinhas. Biologia molecular. Sorologia

ABSTRACT

SEIXAS, M. M. M. **Study of Influenza vírus in seabirds of subantarctica region.** 2014. 111 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Influenza virus (AI) have caused epidemics and pandemics in humans, and are also capable of causing weakness and mortality in other species. Wild birds are considered the natural reservoir of influenza A viruses, among these, migratory species may have an important role as transmitting agents in the spread of diseases. The Antarctic region is home to large populations of seabirds that breed during the austral summer forming colonies with thousands of individuals. Increased human activity and consequent risk of introducing diseases into the wild life in inhospitable places, such as Antarctica, leverage the importance of studying the epidemiology of AI viruses in marine, migratory and resident birds in this environment. Therefore, the objective of this study was to understand the ecology of AI viruses in Antarctic environment through serological and molecular biological tests performed on biological material from seabirds caught in the sub-antarctic region. Between 2010 and 2013 biological samples from seabirds were collected in three scientific expeditions undertaken in Elephant and King George islands. Of the 585 birds sampled by cloacal and tracheal swab, 13 individuals were positive by Real Time One Step RT-PCR, species *Pygoscelis antarcticus* (chinstrap penguin) and *Catharacta lonnbergi* (brown skua). Latter sample was characterized as being from the H6N8 IA subtype, similar to another previously isolated in Argentina. Of the 673 birds sampled by serum, 108 were positive by competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA), from the same species tested positive by molecular technique, and *P. adeliae* (Adelie penguin). The results demonstrate that IA virus circulates in sub-Antarctic environment, and that there is a possible route of introduction in the continent through Argentina. This study contributed to the knowledge of AI viruses in Antarctica and recommends preventive measures to both human health and animal in Antarctica.

Keywords: Influenza. Antarctica. Seabirds. Molecular biology. Serology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Diagrama esquemático da estrutura do vírus Influenza A.....	28
Figura 2	Representação esquemática do ciclo do vírus Influenza A.....	30
Figura 3	Representação esquemática dos rearranjos do vírus Influenza nas últimas pandemias. A pandemia de 1918 foi provavelmente causada pela transmissão de um vírus aviário H1N1 ao homem; em 1957 e 1968, o rearranjo de proteínas hemaglutinina, neuraminidase e PB1, originárias de vírus aviário, introduzidos na população humana gerou novas pandemias; o vírus H1N1, e 1977, e o H3N2, de 1968, circulam até hoje.....	36
Figura 4	Imagem Google Earth da região entre a América do Sul e a Península Antártica. Evidenciado em pontilhado está a localização do arquipélago das Ilhas Shetland do Sul.....	38
Figura 5	Distribuição populacional no mapa das espécies A. <i>Pygoscelis adeliae</i> (pinguim-de-Adelie); B. <i>P. antarcticus</i> (pinguim-de-barbicha); e C. <i>P. papua</i> (pinguim-papua).....	43
Figura 6	Distribuição populacional no mapa das espécies A. <i>Daption capense</i> (pomba-do-cabo); e B. <i>Macronectes giganteus</i> (petrel-gigante-do-sul).....	44
Figura 7	<i>Catharacta lonnbergi</i> (skua-subantártica) e sua distribuição populacional.....	46
Figura 8	Mapa de localização das Ilhas Shetland do Sul, evidenciando a Ilha Elefante e Rei George.....	51
Figura 9	Mapa da Ilha Elefante e da região de Stinker Point, evidenciada pelo ponto em vermelho, local da ilha onde foram realizadas as coletas das amostras deste estudo.....	52
Figura 10	Mapa da Ilha Rei George, evidenciando os locais região onde foram realizadas as coletas das amostras deste estudo, pelos pontos em vermelho.....	53

Figura 11	Coleta de <i>swab</i> orotraqueal (A) e cloacal (B) em <i>Pygoscelis papua</i> (pinguim-papua).....	54
Figura 12	Coleta de sangue em indivíduo da Ordem Sphenisciformes (A) e em <i>Catharacta lonnbergi</i> (skua-subantártica) (B).....	55
Figura 13	Fluxograma de todas as análises laboratoriais realizadas neste estudo.	56
Figura 14	Gráfico mostrando a distribuição de indivíduos amostrados com coleta de <i>swab</i> nos verões 2010-11, 2011-12 e 2012-13, nas Ilhas Elefante e Rei George.....	69
Figura 15	Gráfico mostrando a distribuição de indivíduos amostrados com coleta de soros nos verões 2010-11, 2011-12 e 2012-13, nas Ilhas Elefante e Rei George.....	71
Figura 16	Placa de sorologia por ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA). As amostras positivas, em vermelho, e o controle positivo, em preto.....	72
Figura 17	Gráfico mostrando a distribuição de amostras positivas na sorologia de acordo com os meses de coleta e as espécies, na Ilha Elefante.....	73
Figura 18	Gráfico mostrando a distribuição de amostras positivas na sorologia de acordo com os meses de coleta e as espécies, na Ilha Rei George....	73
Figura 19	Curvas de fluorescência das treze amostras positivas e do controle positivo pelo <i>One Step Real Time RT-PCR</i> ; a linha verde indica o <i>threshold</i>	74
Figura 20	Gráfico mostrando a distribuição de amostras positivas na detecção viral de acordo com os meses de coleta e as espécies.....	76
Figura 21	Alinhamento das sequências da proteína de Matriz do vírus Influenza A, de 245 bp, geradas pelas amostras positivas e pelo controle positivo (C+). O alinhamento demonstra a similaridade entre as amostras positivas e o controle positivo de Influenza A.....	78
Figura 22	Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, dos produtos amplificados dos oito segmentos virais do Influenza A na amostra AE66	

(vermelho). As setas indicam as proteínas virais amplificadas e seus respectivos tamanhos. O peso molecular utilizado foi o *50pb DNA ladder (Invitrogen by Lifetechnologies)*.....79

Figura 23 Dendrograma construído a partir da sequência completa da glicoproteína viral hemaglutinina (HA) proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras sequências de HA, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro GTR (*General Time Reversible*) indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 70% foi obtido em análise de 1000 réplicas e está apresentado nos pontos de ramificação. A análise das sequências demonstra que a HA encontrada neste estudo, em vermelho, está associada ao tipo H6. Em azul, o clado da H11, onde está a HA encontrada na região subantártica por Hurt e colaboradores (2014), evidenciando a distância entre as HA encontradas na região.....80

Figura 24 Dendrograma construído a partir da sequência completa da glicoproteína viral neuraminidase (NA) proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras sequências de NA, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro GTR (*General Time Reversible*) indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 90% foi obtido em análise de 1000 réplicas e está apresentado nos pontos de ramificação. A análise das sequências demonstra que a NA encontrada neste estudo, em vermelho, está associada ao tipo N8. Em azul, o clado da N2, onde está a NA encontrada na região subantártica por Hurt e colaboradores (2014), evidenciando a distância entre as NA encontradas nesta região.....81

Figura 25 Dendrograma construído a partir da sequência completa da glicoproteína viral hemaglutinina (HA) 6 proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras sequências de H6, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro GTR (*General Time Reversible*)

indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 60% foi obtido em análise de 1000 réplicas e está apresentado nos pontos de ramificação. A análise das sequências demonstra que a H6 encontrada neste estudo, em vermelho, está associada a um clado bem definido para outras H6 encontradas na Argentina.....82

Figura 26 Dendrograma construído a partir da sequência completa da glicoproteína viral neuraminidase (NA) 8 proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras sequências de N8, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro GTR (*General Time Reversible*) indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 60% foi obtido em análise de 1000 réplicas e está apresentado nos pontos de ramificação. A análise das sequências demonstra que a N8 encontrada neste estudo, em vermelho, está associada a um clado bem definido para outras N8 encontradas na Argentina.....83

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Organização do genoma do vírus Influenza A.....	28
Quadro 2	Cálculos para a interpretação dos resultados da sorologia.....	57
Quadro 3	Sequências dos <i>primers</i> utilizados na RT-PCR para a proteína da Matriz.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição dos indivíduos amostrados com coleta de <i>swab</i> por espécie, local, data e período de captura.....	68
Tabela 2	Distribuição dos indivíduos amostrados com coleta de soro por espécie, local e período de captura.....	70
Tabela 3	Detalhes das amostras positivas por <i>One Step Real Time RT-PCR</i>	75
Tabela 4	Distribuição dos indivíduos amostrados com coleta de soro e <i>swab</i> orotraqueal e cloacal, que tiveram as amostras analisadas por sorologia e detecção viral, nas ilhas Elefante e Rei George.....	77
Tabela 5	Detalhes dos indivíduos amostrados com coleta de soro e <i>swabs</i> , e que tiveram suas amostras positivas por sorologia e detecção viral.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AS	ácido siálico
BLAST	<i>Basic Alignment Search Tool</i>
BSL	nível de biossegurança (<i>biossecurity level</i>)
C	carbono
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CEMAVE	Centro Nacional de Pesquisa e Conservação das Aves Silvestres
CIRM	Comissão Interministerial para os Recursos do Mar
Cl	cloro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	ciclos de amplificação
DNA	ácido desoxirribonucleico
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
cELISA	Ensaio Imunoenzimático competitivo (<i>competitive enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FLA	fragmentos ligados aos adaptadores
G	força gravitacional
Gal	galactose
HA	hemaglutinina
HI	reação de inibição da hemaglutinação
HPAI	vírus Influenza aviário altamente patogênico (<i>high pathogenic avian Influenza</i>)
HPNAI	vírus Influenza aviário altamente patogênico e de notificação obrigatória (<i>high pathogenic notifiable avian Influenza</i>)
IA	Influenza A

ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IGDA	Imunodifusão em gel de agarose
LOAM	Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos
LPAI	vírus Influenza aviário pouco patogênico (<i>low pathogenic avian Influenza</i>)
LPNAI	vírus Influenza aviário pouco patogênico e de notificação obrigatória (<i>low pathogenic notifiable avian influenza vírus</i>)
LVCM	Laboratório de Virologia Clínica e Molecular
M	molar
mM	milimolar
MAE	módulos antárticos emergenciais
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Mg	magnésio
ML	máxima verossimilhança (<i>maximum likelihood</i>)
mL	mililitro
NA	neuraminidase
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NP	nucleoproteína
nm	nanômetro
O	oxigênio
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
p	peso
pb	pares de bases
PBS	tampão fosfato-alcalino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	reação de polimerase em cadeia (<i>polymerase chain reaction</i>)
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>

pH	potencial hidrogeniônico
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
RNA	ácido ribonucleico (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAc	ácido ribonucleico complementar
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RNAv	ácido ribonucleico viral
RNP	ribonucleoproteína
RT	transcriptase reversa (<i>reverse transcriptase</i>)
SCAR	Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (<i>Scientific Committee on Antarctic Research</i>)
SPF	livre de patógeno (<i>specific pathogen free</i>)
U	unidade
UNISINOS	Universidade do Vale do Rio do Sinos
USP	Universidade de São Paulo
V	volt
W	oeste
µg	micrograma
µL	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
α	alpha
°	grau
'	minuto
μ	micro
®	marca registrada
\geq	maior e igual
<	menor
R\$	real (moeda)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Vírus Influenza A	26
2.1.1 <i>Classificação e nomenclatura virais</i>	26
2.1.2 <i>Características estruturais e genéticas</i>	27
2.1.3 <i>Ciclo viral</i>	29
2.1.4 <i>Patogenicidade e determinantes de virulência</i>	31
2.1.5 <i>Diagnóstico</i>	33
2.1.5.1 Métodos de diagnóstico direto.....	33
2.1.5.2 Métodos de diagnóstico indireto.....	35
2.1.6 <i>Pandemias</i>	35
2.2 Antártica	37
2.2.1 <i>Características gerais</i>	37
2.2.2 <i>Pesquisa na Antártica</i>	40
2.2.3 <i>Aves marinhas</i>	41
2.2.3.1 <i>Ordem Sphenisciformes</i>	42
2.2.3.2 <i>Ordem Procellariiformes</i>	44
2.2.3.3 <i>Ordem Charadriiformes</i>	45
2.3 Influenza A em aves marinhas da região subantártica	46
3 OBJETIVOS	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1 Expedição à Antártica	51
4.1.1 <i>Ilha Elefante</i>	52
4.1.2 <i>Ilha Rei George</i>	52
4.2 Captura das aves, coleta e armazenamento do material biológico	53
4.3 Análises laboratoriais	55
4.3.1 <i>Sorologia</i>	56
4.3.2 <i>Extração do RNA viral</i>	58
4.3.3 <i>Detecção viral</i>	58
4.3.4 <i>Sequenciamento genético</i>	60
4.3.4.1 <i>RT-PCR</i>	60

4.3.4.2 Purificação dos produtos da PCR.....	61
4.3.4.3 Sequenciamento genético - Sanger.....	62
4.3.5 Isolamento viral e Reação de hemaglutinação.....	63
4.3.6 Sequenciamento genético de nova geração.....	64
4.3.6.1 RT-PCR.....	64
4.3.6.2 Purificação dos produtos da PCR.....	65
4.3.6.3 Sequenciamento genético de nova geração - Ion Torrent PGM.....	66
5 RESULTADOS.....	68
5.1 Expedição à Antártica, captura e coleta de material biológico das aves.....	68
5.2 Análises laboratoriais.....	71
5.2.1 Sorologia.....	71
5.2.2 Detecção viral.....	74
5.2.3 Sorologia e Detecção viral.....	76
5.2.4 Sequenciamento genético.....	77
5.2.5 Isolamento viral.....	78
5.2.6 Sequenciamento genético de nova geração.....	79
6 DISCUSSÃO.....	84
6.1 Métodos de diagnóstico.....	84
6.2 Resultados.....	87
6.3 Considerações sobre a presença do vírus Influenza A em aves marinhas da região subantártica.....	90
7 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
APÊNDICE – Lista das amostras positivas por sorologia. Em negrito, as amostras que também foram positivas por biologia molecular.....	109

1 INTRODUÇÃO

Os vírus Influenza são popularmente conhecidos como agentes causadores da gripe, uma síndrome respiratória comum que afeta os tratos respiratórios inferior e superior em humanos (TAUBENBERGER; MORENS, 2008). São três os tipos de vírus Influenza: A, B e C. Dentre estes, o primeiro é considerado o mais importante, devido às diversas epidemias e pandemias que tem causado e por não estar restrito aos humanos. O vírus Influenza tipo A apresenta alto potencial zoonótico, e, já foi isolado em humanos, suínos, equinos, canídeos, felinos, morcegos, mamíferos marinhos, aves domésticas e silvestres (TONG et al., 2012; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

A grande diversidade de subtipos do vírus Influenza A (IA) e suas possibilidades de rearranjos caracterizam este vírus como imprevisível pelo ponto de vista epidemiológico (KILLBOURNE, 2006). Apesar disso, sabe-se que a grande maioria dos subtipos conhecidos já foi detectado em aves aquáticas clinicamente saudáveis e, por isso, essas espécies são consideradas reservatórios naturais do vírus IA (HENAUX et al., 2013; MUNSTER et al., 2007; MUNSTER, FOUCHIER, 2009; REED et al., 2003). A ecologia e o padrão de migração dessas aves podem ter um efeito direto na distribuição global e na diversidade deste vírus (HURT et al., 2014), possibilitando a transmissão do mesmo para locais tão inóspitos como o continente antártico (MILLER et al., 2008).

Apesar do clima extremamente frio, a região antártica abriga enormes populações de aves e mamíferos marinhos. Apenas 2% do território da Antártida permanece livre de gelo durante o verão austral, por isso, as aves marinhas e migratórias que nidificam em terra têm um espaço limitado, o que leva à agregação de milhares de indivíduos durante a época de reprodução (WOODS et al., 2009). Assim, o contato das aves marinhas com as fezes que se acumulam no chão é muito próximo, o que facilita a transmissão de vírus transmitidos pela via fecal-oral, como o vírus IA (ABAD et al., 2013).

Diversos estudos com o vírus IA já foram realizados em aves marinhas na região subantártica. A grande maioria apresentou evidências sorológicas da presença do vírus (ABAD et al., 2013; AUSTIN; WEBSTER, 1993; BAUMEISTER et al., 2004; BRIGGS et al., 2003; MILLER et al., 2008; MORGAN; WEBSTER, 1981; MORGAN; WESTBURY, 1988; WALLENSTEN ET AL. et al., 2006) e apenas um trabalho

conseguiu isolá-lo recentemente em pinguins-de-Adelie na região subantártica (HURT et al., 2014). Isto demonstra que este vírus pode estar circulando nesse continente, e que estudos complementares e periódicos precisam ser realizados para um entendimento melhor do movimento global do vírus IA e de seus reservatórios (HURT et al., 2014).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Vírus Influenza A

Apesar de ficar mundialmente conhecido devido às grandes epidemias e pandemias em humanos, o vírus Influenza A acomete diversas outras espécies animais (WHO, 2012), sendo que as aves aquáticas são consideradas os seus reservatórios naturais (HENAUX et al., 2013; MUNSTER et al., 2007; MUNSTER; FOUCHIER, 2009; REED et al., 2003). Nestas aves, a sintomatologia é bastante variável, dependendo de fatores como o subtipo viral, a espécie infectada, idade, infecções concomitantes, *status* imunológico e fatores ambientais (SWAYNE; PANTIN-JACKWOOD, 2008). Apesar de o contato direto ser uma importante forma de transmissão do vírus, uma vez infectadas, as aves podem liberar altas concentrações virais no ambiente através de secreções respiratórias e oculares, e pelas fezes (SWAYNE, 2008).

2.1.1 Classificação e nomenclatura virais

Os vírus Influenza pertencem à Família *Orthomyxoviridae*, que é composta por cinco gêneros: *Isavirus*, *Thogovirus*, *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B* e *Influenzavirus C* (PALESE, 2007). Os três gêneros de *Influenzavirus* são classificados de acordo com diferenças antigênicas entre suas nucleoproteínas (NP) e proteínas de matriz (M1) virais. Os vírus com baixa homologia (20-30%) entre essas proteínas são classificados em gêneros diferentes; aqueles com alta homologia (>85%) são considerados do mesmo gênero (HAUSE et al., 2014). Os três diferentes gêneros do vírus Influenza apresentam um ancestral comum, no entanto, são geneticamente distantes, de maneira que não ocorre um rearranjo entre eles (PALESE, 2007).

Os vírus Influenza A apresentam ainda subtipos que são divididos de acordo com as características sorológicas de suas duas glicoproteínas virais de superfície: hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Atualmente são conhecidos 18 tipos de HA e 11 tipos de NA, destas, somente H17 e H18, e N10 e N11 não foram observadas em aves, somente em morcegos (TONG et al., 2012; TONG et al., 2013).

A nomenclatura utilizada atualmente para os três gêneros do vírus Influenza foi revisada em 1980 e, desde então se manteve padronizada sem sofrer alterações (CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2014). Essa nomenclatura compõe-se de informações específicas e únicas, divididas em duas etapas: a designação do gênero do Influenza e, apenas para o tipo A, a descrição das especificidades dos seus antígenos de superfície HA e NA. Desta forma, as seguintes informações são separadas por barras verticais: gênero do Influenza/ espécie animal em que foi isolado (omitido quando em humanos)/localização geográfica do isolado/número da estirpe/ano de isolamento. Para o Influenza A, a designação antigênica (subtipo) segue entre parênteses, após as informações da estirpe (WHO, 1980), como por exemplo, A/Adelie penguin/Antártica/178/2013(H11N2).

2.1.2 Características estruturais e genéticas

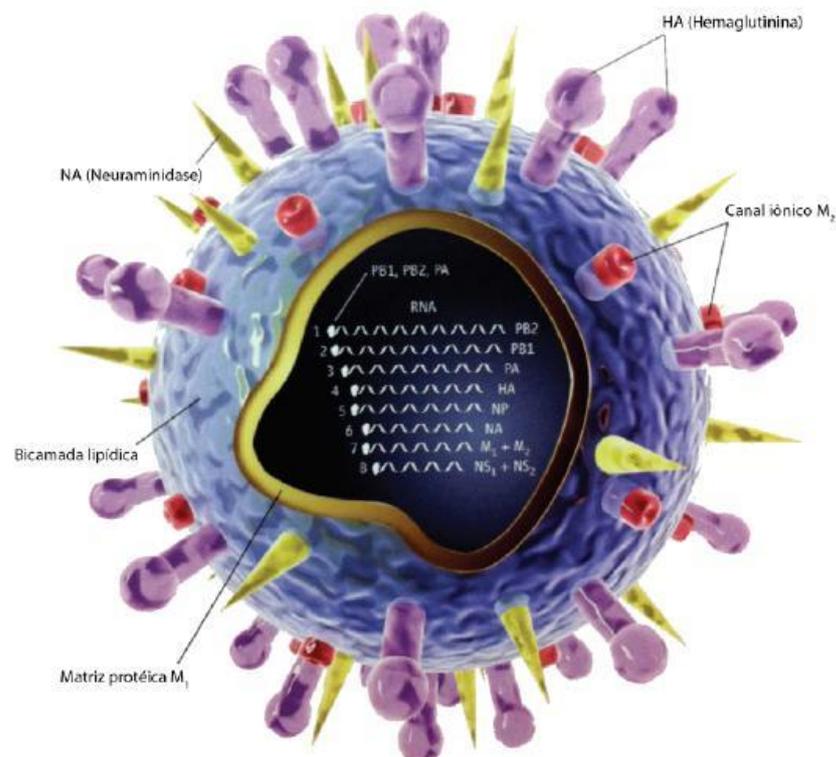
Os vírus Influenza A são partículas com morfologia esférica, com diâmetro entre 80-120nm, ou filamentosa, de até 300nm. A composição viral é de 1% de ácido ribonucleico (RNA), 70% de proteínas, 20% de lipídeos e 5-9% de carboidratos (MURPHY; WEBSTER, 1996). São formados externamente por uma bicamada lipídica derivada da membrana plasmática do hospedeiro, chamada de envelope e, internamente, por uma camada proteica eletrodensa ou capsídeo, formada por proteína M1. Na bicamada lipídica dos vírus IA existem três estruturas proteicas: duas glicoproteínas de superfície em formato de espículas, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), e a proteína M2 (PALESE, 2007; MOULD et al., 2000). No interior do capsídeo está o genoma viral, formado por RNA segmentado, de fita simples com polaridade negativa (PALESE, 2007) (Figura 1).

O vírus IA têm oito segmentos de RNA que codificam 11 a 12 proteínas (Quadro 1) (SRIWILAIJAROEN; SUZUKI 2012). Cada segmento está associado com três proteínas polimerase (PB1, PB2 e PA) e a uma nucleoproteína (NP), formando o complexo ribonucleoproteína (RNP) (MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011). Este complexo age estabilizando o genoma e protegendo-o contra RNAases do hospedeiro. Os oito segmentos de RNA viral codificam proteínas estruturais e não estruturais, e cada uma tem uma função importante durante todo o processo de replicação do vírus (Figura 1) (DAS et al, 2010; SRIWILAIJAROEN; SUZUKI, 2012).

Quadro 1- Organização do genoma do vírus Influenza A.

Segmento viral	Tamanho do segmento (pb)	Proteína codificada
1	2341	PB2
2	2341	PB1 PB1-F2 N40
3	2233	PA
4	1778	HA
5	1565	NP
6	1413	NA
7	1027	M1 M2
8	890	NS1 NS2/NEP

Fonte: Neumann et al. (2000), adaptado de Hurtado (2013).

Figura 1: Diagrama esquemático da estrutura do vírus Influenza A.

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

Os segmentos 1, 2 e 3 do RNA codificam as proteínas PB2, PB1 e PA, respectivamente. Estas compõem a polimerase viral e possuem atividade de transcriptase (SRIWILAIJAROEN; SUZUKI, 2012). Sabe-se que o segmento 2 também codifica as proteínas N40 e PB1-F2, no entanto, a função de ambas é pouco

esclarecida, e sabe-se apenas que a PB1-F2 participa dos determinantes de patogenicidade viral (MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011; SRIWILAIJAROEN; SUZUKI, 2012). O segmento 4 codifica a hemaglutinina, uma glicoproteína de superfície viral muito imunogênica. Esta se liga ao receptor de ácido siálico na superfície celular e age na fusão da partícula viral com a membrana endossômica, o que permite o acesso viral ao citoplasma celular do hospedeiro. A nucleoproteína NP, codificada pelo segmento 5, liga-se ao RNA viral e o encapsida, estabilizando-o e protegendo-o da ação de RNAses do hospedeiro (MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011). A neuraminidase é codificada pelo segmento 6, e tem a função de facilitar o acesso e dispersão da partícula viral à superfície das células através da degradação de ácido siálico do muco extracelular (DAS et al., 2010). O segmento 7 codifica as proteínas M1 e M2. A primeira faz parte da matriz protéica a qual forma uma camada eletrodensa logo abaixo do envelope viral; a segunda é uma proteína formadora de canais iônicos que têm a função de permitir a acidificação no interior dos vírions quando estes se encontram nos endossomos celulares, isto favorece o desnudamento viral (SRIWILAIJAROEN; SUZUKI, 2012). Duas proteínas são codificadas pelo segmento 8: a NS1 é inibidora do processamento pós-transcricional de RNA mensageiro celular; a NS2, ou NEP, tem a função de mediar a exportação nuclear dos RNAs do vírion (DAS et al., 2010).

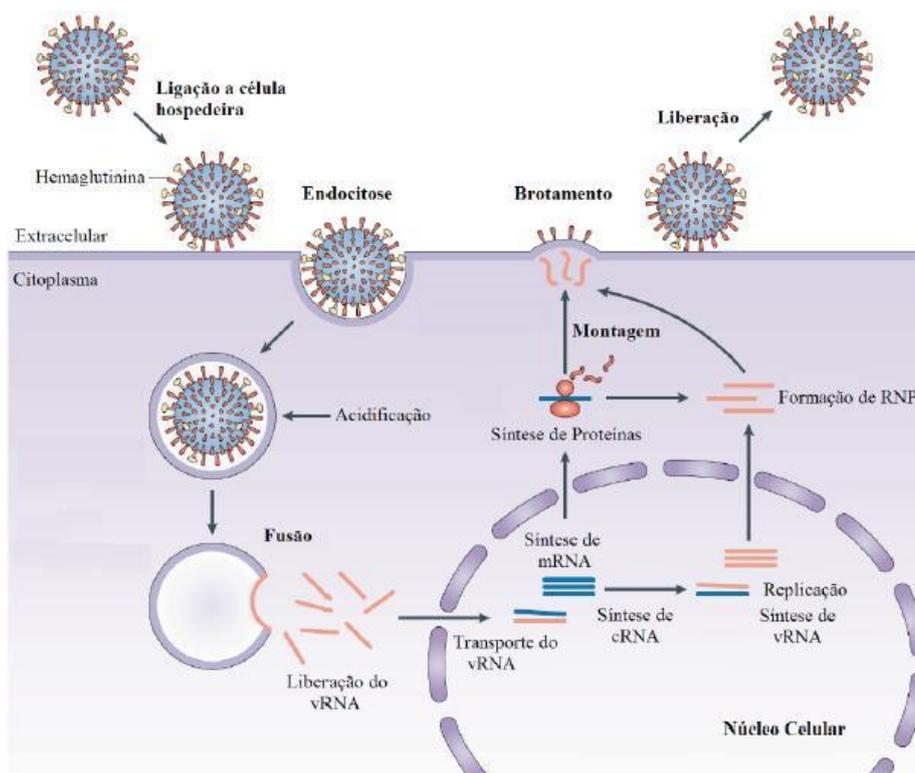
2.1.3 *Ciclo viral*

Nas aves, a transmissão do vírus Influenza A é prioritariamente do tipo fecal-oral. Sendo assim, a replicação viral ocorre no trato intestinal e o vírus é excretado nas fezes (FEREIDOUNI et al., 2010; KAWAOKA, 2007). Quando a partícula viral é ingerida por esses animais, esta liga-se aos ácidos siálicos da superfície celular de seu epitélio, através de receptores presentes na glicoproteína de superfície viral HA e, assim o vírion é endocitado. A clivagem da HA é necessária para que haja a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossomo. A acidificação da vesícula endocítica abre os canais iônicos formados pela proteína M2, acidificando o interior do vírion. Este processo é necessário para liberar os complexos de ribonucleoproteína (RNPs) no citoplasma da célula hospedeira (MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011).

As RNPs entram no núcleo e as etapas de replicação e transcrição iniciam-se. Nessas etapas, as proteínas com função de polimerase viral (PB1, PB2 e PA) são

essenciais. Primeiramente, na replicação elas agem no RNA viral (RNAv) fita simples de polaridade negativa, transcrevendo-o em RNA viral complementar (RNAc), fita simples de polaridade positiva. Este será continuamente transcrito em mais cópias de RNAv. Nesse momento, as proteínas NPs agem no novo RNAv produzido para formar os complexos RNPs. Além da replicação, as polimerases virais atuam também na transcrição, agindo no RNA mensageiro (RNAm) do hospedeiro, processo este chamado de *cap snatching*. Este consiste em retirar o sinal iniciador de transcrição do RNAm do hospedeiro, ligá-lo ao RNAv, formando RNAm viral que será exportado para o citoplasma, onde ocorrerá a formação das proteínas virais (DAS et al., 2010; MEDINA; GARCIA-SASTRE, 2011) (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática do ciclo do vírus Influenza A.



Fonte: von Itzstein (2007), adaptado de Hurtado (2013).

No citoplasma do hospedeiro todas as proteínas virais são traduzidas e direcionadas às suas funções: as proteínas HA, NA e M2 são transportadas para a membrana celular; as PB1, PB2, PA e NP vão para o núcleo agir na transcrição e replicação do RNAv; as NS1 atuam inibindo a produção de proteínas do hospedeiro; e as M1 e NS2 sinalizarão aos novos RNPs à exportação nuclear para que atinjam a

membrana celular do hospedeiro (DAS et al., 2010; SRIWILAIJAROEN; SUZUKI, 2012).

À medida em que a infecção progride, a membrana plasmática do hospedeiro torna-se enriquecida com proteínas virais. Estas juntas irão coordenar o brotamento da partícula viral em torno dos RNPs. O modo de interação das proteínas virais durante a formação de um vírion ainda é mal compreendido, supõem-se porém, que o brotamento seja promovido pela chegada dos complexos RNPs à superfície da célula hospedeira (HUTCHINSON; FODOR, 2013). Assim que o novo vírus sai dessas células, suas HAs apresentam terminais de ácido siálico (AS) que se aderem aos AS da superfície da célula. Essa ligação é desfeita pelas NAs que clivam esses resíduos de AS liberando o novo vírus (DAS et al., 2010).

2.1.4 Patogenicidade e determinantes de virulência

Nas aves, os vírus Influenza A podem ser divididos em dois grupos de acordo com sua patogenicidade: os vírus Influenza aviário pouco patogênicos (LPAI, do inglês *Low Pathogenic Avian Influenza*) e os vírus Influenza aviário altamente patogênicos (HPAI, do inglês *Highly Pathogenic Avian Influenza*) (ALEXANDER, 2007).

Vírus LPAI são definidos como aqueles que, quando inoculados em frangos com idade entre 4-8 semanas de vida, levam ao óbito menos de 75% dos animais em até 10 dias. Como as aves aquáticas são consideradas os reservatórios destes vírus, essas espécies geralmente são assintomáticas ou apresentam sinais clínicos brandos, como conjuntivite, lacrimejamento e coriza. As aves domésticas podem apresentar expressiva queda na produção de ovos, sintomas respiratórios leves a moderados e baixa mortalidade (ALEXANDER, 2000).

Os vírus HPAI são definidos como aqueles que, quando inoculados em frangos com idade entre 4-8 semanas de vida, levam ao óbito mais de 75% dos indivíduos em até 10 dias. (ALEXANDER, 2000). Todos os vírus HPAI conhecidos até o momento pertencem aos subtipos H5 ou H7, no entanto, apenas uma pequena percentagem de todos os vírus H5 e H7 são altamente patogênicos (KAWAOKA, 2007). A Organização Mundial em Saúde Animal (OIE) revisou o código sanitário para a definição de notificação para vírus IA. Além dos vírus Influenza A altamente patogênicos e de notificação obrigatória (HPNAI), atualmente existe a obrigatoriedade de notificação para os surtos de Influenza A, cujos subtipos H5 e H7 sejam também de baixa

virulência (LPNAI) (ALEXANDER, 2008; WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2010). A preocupação, no caso dos LPAI dos tipos H5 e H7, é que possam sofrer mutações, e transformarem-se em HPAI (MINH, 2010).

Na infecção por HPAI, as aves domésticas geralmente apresentam curso da doença fulminante e morte antes do aparecimento dos sinais clínicos (BRASIL, 2009). As aves aquáticas podem ser resistentes a esses vírus, no entanto, casos fatais já foram relatados em patos selvagens, biguás, cisnes, gaivotas e andorinhas (CHEN et al., 2006; ELLIS et al., 2004; OLSEN et al., 2006; STURM-RAMIREZ et al., 2005)

Tanto as glicoproteínas HAs quanto as NAs precisam reconhecer os ácidos siálicos (AS) presentes na membrana celular do hospedeiro, para que a partícula viral se ligue e se desligue da célula, respectivamente. Existem AS com ligações de galactose do tipo α 2-3 ou α 2-6. Ambas ligações são reconhecidas pelos vírus Influenza A. No entanto, estirpes diferentes apresentam clara preferência por ligações diferentes. Os vírus Influenza humano e suíno ligam-se aos AS com ligações de galactose (Gal) α 2-6 (AS α 2-6Gal), enquanto os aviários e equinos ligam-se aos AS com ligações Gal α 2-3 (AS α 2-3Gal) (MAINES et al., 2008; PALESE, 2007; SRIWILAIJAROEN; SUZUKI, 2012).

As células do trato respiratório superior de humanos apresenta predominantemente AS α 2-6Gal, enquanto em suínos predominam AS α 2-6Gal e AS α 2-3Gal. Os AS com ligações Gal são encontrados nas células embrionárias de galinhas e patos, no entanto, AS α 2-3Gal são mais abundantes no trato intestinal de aves adultas, onde os vírus aviários replicam-se. Os equinos apresentam AS α 2-3Gal no epitélio do seu trato respiratório superior. Essa distribuição dos AS, com diferentes ligações galactose no epitélio das diferentes espécies, demonstra uma relação entre a patogenicidade e a especificidade das estirpes do Influenza A. Da mesma forma, a capacidade do vírus de ligar-se e desligar-se das células que contém esses AS é considerada um indicador primário de seu potencial transmissor entre hospedeiros (SRIWILAIJAROEN; SUZUKI, 2012).

Além da patogenicidade, as características antigênicas dos vírus IA também são determinadas pelas glicoproteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). As variações genéticas nessas duas glicoproteínas geram mudanças antigênicas que podem ocorrer por dois mecanismos: o *shift* e o *drift* antigênicos (CHEN; DENG, 2009).

O *drift* antigênico ocorre por mutações pontuais e cumulativas ao longo do tempo. São pequenas variações, como por exemplo, a substituição de um aminoácido nas HA e NA. Essas pequenas mudanças produzem novas estirpes que não podem ser reconhecidas pelo sistema imune do hospedeiro, causando nova doença (CDC, 2011).

O *shift* antigênico, no entanto, ocorre por mudanças abruptas maiores, resultando em um subtipo contendo uma nova HA, ou com novas combinações de HAs e NAs. Podem ocorrer rearranjos entre vírus humano e animal, ou mesmo a transmissão direta de um vírus animal para os seres humanos. Em todos os casos, o novo subtipo formado é antígenicamente distinto dos que circulavam anteriormente, o que resultaria em altas taxas de infecção na população sem resistência imune (CDC, 2011). Esse tipo de variação antigênica é preocupante, pois, se o novo subtipo adaptar-se a população recém-infectada poderá provocar elevadas taxas de morbidade e, possivelmente, mortalidade (PALESE, 2007).

2.1.5 Diagnóstico

Para a escolha do método de diagnóstico para o vírus Influenza A deve-se considerar o custo, complexidade, sensibilidade e especificidade do método, bem como o objetivo do estudo, e a disponibilidade de tempo e de mão-de-obra capacitada. Para garantir a qualidade do diagnóstico, as coletas devem ser realizadas por profissional habilitado, com o uso dos equipamentos de proteção individual e armazenamento adequado das amostras coletadas (SPACKMAN et al., 2008; WHO, 2006). Nas aves, o principal material biológico a ser coletado são os *swabs* orotraqueal e cloacal, seguido das amostras de fezes e sangue (WHO, 2006).

2.1.5.1 Métodos de diagnóstico direto

Os métodos de diagnóstico direto do vírus são aqueles baseados na detecção da partícula viral, proteínas ou ácidos nucleicos virais, como o isolamento viral, testes de detecção de antígenos e os testes moleculares (BROOKS et al., 2012; SPACKMAN et al., 2008).

O isolamento em ovo embrionado e em cultura celular são os testes de referência para o diagnóstico do vírus Influenza (seguido de identificação viral por técnicas imunológicas ou genéticas), pela alta sensibilidade de ambos na detecção do vírus em qualquer estágio da infecção ativa. Entretanto, exigem tempo prolongado, pessoal capacitado, laboratório com alto nível de biossegurança, além da boa manutenção dos ovos e células (SPACKMAN et al., 2008; WHO, 2006). Atualmente, o isolamento em cultura celular está se tornando o padrão-ouro para o diagnóstico viral do IA (WHO, 2011).

A prova de imunodifusão em gel de ágar (IDGA) é uma técnica simples de precipitação de antígenos por anticorpos. A técnica permite a visualização do complexo antígeno-anticorpo em uma linha de precipitação, o que confirma uma reação positiva (STRECK et al., 2007). É uma prova de simples realização e não necessita de materiais nem equipamentos de alto custo (SPACKMAN et al., 2008).

As técnicas de biologia molecular para a detecção do vírus são bastante eficazes por sua alta sensibilidade e especificidade. Além disso, têm um custo moderado, possibilidade de uso de diversos tipos de material biológico e boa reprodutibilidade (STEININGER et al., 2002). A reação de transcriptase reversa (RT), seguida da reação de polimerase em cadeia (PCR) em tempo real é a técnica de biologia molecular padrão para a detecção e quantificação viral. Essa técnica é rápida e possui maior especificidade e sensibilidade, quando comparada à PCR convencional (SPACKMAN et al., 2008).

No caso do vírus Influenza A, existem provas diagnósticas diretas que permitem a subtipificação das glicoproteínas virais HA e NA, como a reação de inibição da hemaglutinação (HI) e o sequenciamento genético. Nesses casos, há a caracterização genética e patogênica da estirpe viral (BROOKS et al., 2012; SPACKMAN et al., 2008).

O sequenciamento genético dos produtos da PCR pode fornecer informações filogenéticas importantes de um vírus cujo ácido nucleico foi amplificado. No sequenciamento genético tradicional de Sanger, a obtenção da sequência de nucleotídeos ocorre a partir de uma PCR específica para regiões do genoma viral, as quais serão marcadas com didesoxinucleosídeos, e identificadas por sequenciador automático (STORCH, 2005). No caso dos sequenciamentos genéticos de nova geração, existe uma diversidade de metodologias diferentes, entretanto, a diferença é que todas conseguem sequenciar fragmentos genéticos muito mais longos que o sequenciamento tradicional de Sanger (DELANGUE et al., 2014). A limitação desta

técnica se dá pelo alto custo e necessidade de profissional capacitado (SPACKMAN et al., 2008).

2.1.5.2 Métodos de diagnóstico indireto

Os métodos de diagnóstico indiretos baseiam-se na detecção da resposta imune do hospedeiro aos antígenos virais e, portanto, indicam a exposição ao antígeno e não à infecção propriamente dita. São testes de amplo uso e relativamente baratos, quando comparados aos métodos de detecção viral (BROOKS et al., 2012; SPACKMAN et al., 2008).

O método de ELISA (do inglês, *Enzyme-linked immunosorbent assay*) utiliza o conceito de imunologia básica na qual a ligação antígeno e anticorpo é específica. A partir dessa ligação, pode-se detectar quantidades muito pequenas de antígenos (proteínas e peptídeos) ou de anticorpos em uma amostra de fluido (GAN; PATEL, 2013). O ELISA é um método mais rápido, quando comparado a outros testes de diagnóstico indireto, no entanto, apesar de ter uma boa sensibilidade, o número de falsos-positivos é alto (SPACKMAN et al., 2008).

A reação de inibição da hemaglutinação (HI) baseia-se na propriedade que as proteínas virais dos vírus IA têm em causar a aglutinação de eritrócitos de galinha *in vitro*. Assim, a presença de anticorpos capazes de inibir a reação de hemaglutinação, em uma amostra derivada de isolamento viral, determina a identificação e caracterização da proteína viral presente (STRECK et al, 2007).

2.1.6 Pandemias

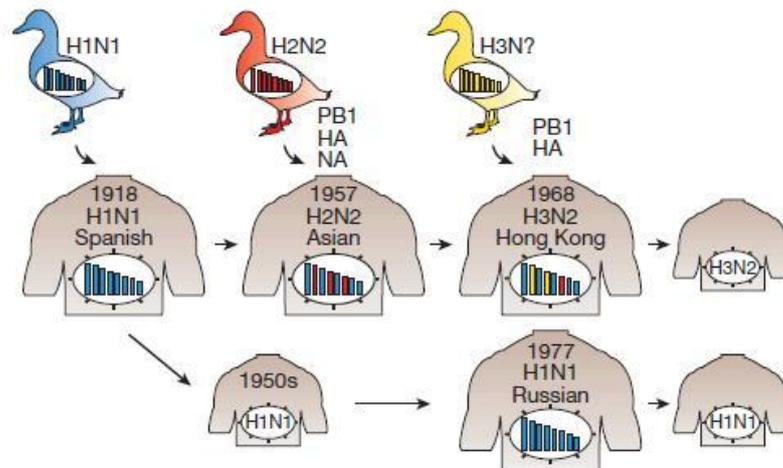
As informações encontradas sobre pandemias de Influenza nos séculos XVIII e XIX relatam que, por diversas vezes, a população humana entrou em contato com este vírus. Em 1729 na Rússia, com disseminação para a Europa; em 1781 na China, e novamente na Rússia e Europa; em 1830-2, cerca de 20-25% da população da China, Europa e América do Norte foram infectadas (BRESALIER, 2012; POTTER, 2001).

Em 1918, a maior pandemia do vírus Influenza infectou aproximadamente 50% da população mundial, levando a óbito mais de 50 milhões de pessoas (SALOMON; WEBSTER, 2009). O vírus envolvido nesta pandemia foi o subtipo H1N1 de origem

puramente aviária, e que passou para os seres humanos após adaptação genética (SALOMON; WEBSTER, 2009).

Em 1957 e 1968, estirpes caracterizadas como híbridas que continham genoma recombinante de vírus IA aviário e humano causaram novas pandemias (Figura 3), ambas originárias de Hong Kong (KILBOURNE, 2006). O vírus que causou a primeira foi do subtipo H2N2, conhecido como IA asiático, e levou a óbito mais de um milhão de pessoas. Na pandemia de 1968, em apenas algumas semanas já havia o relato de mais de 500 mil pessoas infectadas pelo então IA, H3N2, e um total de aproximadamente 700 mil pessoas morreram (CRADDOCK; HANNOUN, 2010).

Figura 3: Representação esquemática dos rearranjos do vírus Influenza nas últimas pandemias. A pandemia de 1918 foi provavelmente causada pela transmissão de um vírus aviário H1N1 ao homem; em 1957 e 1968, o rearranjo de proteínas HA, NA e PB1, originárias de vírus aviário, introduzidos na população humana gerou novas pandemias; o vírus H1N1, de 1977, e o H3N2, de 1968, circulam até hoje.



Fonte: Neumann et al.,(2009).

Em novembro de 1977, novos eventos de gripe causados pelo Influenza A, H1N1, ocorreram na então União Soviética. Esta estirpe do vírus foi considerada molecularmente similar àquela da pandemia de 1957 e, portanto, a prevalência da baixa faixa etária infectada em 1977 foi atribuída à ausência de ocorrência de um vírus tão similar ao H2N2 desde 1957 (KILLBOURNE, 2006).

Em 2009 um novo vírus IA, H1N1, ultrapassou a barreira espécie-específica e, a partir de suínos, tornou-se patogênico para humanos (SCHNITZLER; SCHNITZLER, 2009), devido a um triplo rearranjo viral, no qual células do trato respiratório de suínos

foram co-infectados com vírus influenza A, humano e aviário, gerando um vírus com características de ambos (WANG; PALESE, 2009). Neste ano o vírus circulou por mais de 170 países e colocou a saúde pública mundial em alerta (SÃO PAULO, 2009).

2.2 Antártica

A Antártica é o continente mais ao sul do planeta, o quinto maior deles e o único sem divisão política (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2012). A região antártica é a maior área selvagem natural que resta no planeta. O continente é o mais remoto, frio e ventoso, e a natureza, a mais livre de influência humana dentre todas as regiões da terra (BRASIL, 2012).

O continente foi avistado pela primeira vez em 1820, na expedição do capitão russo Von Bellingshausen, no entanto, o pólo sul só foi alcançado em 1911, pelo norueguês Roald Amundsen e sua equipe (HEADLAND, 1989). Atualmente, a ocupação humana se limita às bases de pesquisa dos países signatários do Tratado da Antártica, e ao turismo crescente (ANTARCTIC TREATY SECRETARY, 2011).

2.2.1 Características gerais

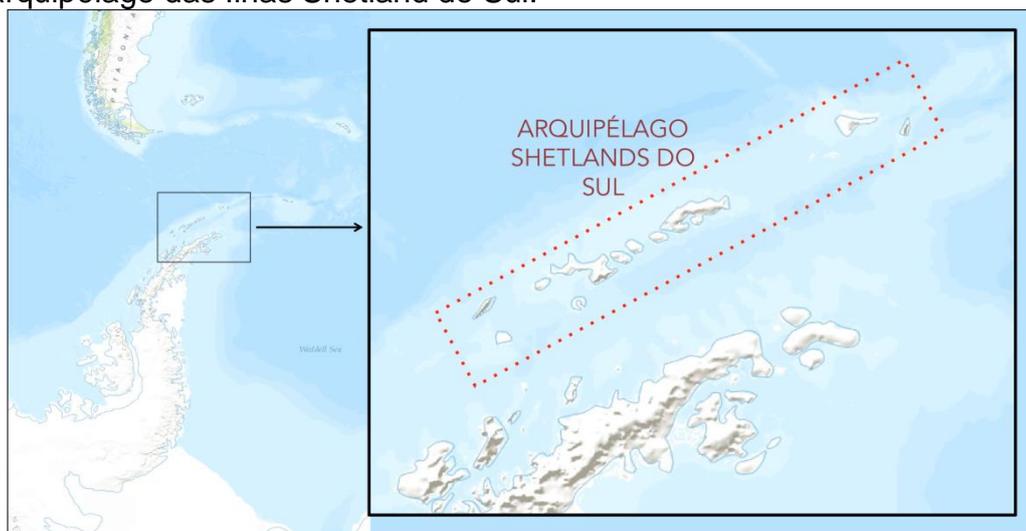
O continente antártico tem uma área de 14 milhões de km², sendo 99,5% destes, coberto de gelo permanentemente. A espessura do gelo que recobre o continente pode chegar a quase cinco mil metros (UFRGS, 2012) e representa 70% da água doce do mundo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO, 2012). A porção continental que está fora do círculo polar antártico, é a Península Antártica. Esta península está localizada entre o Mar de Weddell (leste) e o Mar de Bellingshausen (oeste) (ANTARCTICA OCEAN LEGACY, 2012), e é formada por uma cordilheira com 1.500m de altitude média e mais de 2.500 km de extensão, sentido norte-sul (BRASIL, 2006).

Apesar de tanta água, a Antártica é o continente de clima mais seco, porque as baixas temperaturas não permitem a evaporação (CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO, 2012). O Oceano Antártico ou Austral circunda o continente e é o principal meio pelo qual ocorrem as trocas de energia, calor e massa entre as três bacias oceânicas (Atlântico, Índico e Pacífico), tendo, portanto, um papel essencial no sistema climático global (BRASIL, 2006).

A Antártica possui papel importante no balanço de energia do planeta, pois controla a circulação atmosférica nas regiões de latitudes altas e médias do hemisfério sul. A temperatura média anual no interior do continente é baixa, entre -25°C e -45°C . Esta grande variação marca os contrastes dos períodos de verão e inverno. No inverno austral registra-se temperatura em torno de -55°C , enquanto nas áreas costeiras, -20°C . Durante o verão, a temperatura no platô antártico é de -35°C , e de 0°C na costa (BRASIL, 2006). Estudos vêm demonstrando um aumento na temperatura da superfície do Oceano Antártico e nas Ilhas Shetland do Sul, de 1°C em cinco décadas (HILL, 2013; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS, 2014).

Ao norte da Península Antártica existem diversas ilhas pertencentes ao arquipélago Shetland do Sul (Figura 4), região onde ocorre a 'zona de convergência antártica'. Esta zona é formada pelas águas frias do Oceano Austral, formadas sob as plataformas de gelo do continente antártico, que submergem sob as águas quentes dos oceanos Atlântico e Pacífico (BRASIL, 2006). Deste encontro de águas, origina-se uma alta concentração de nutrientes, fitoplâncton e do krill, contribuindo para a abundância e diversidade de fauna marinha da região (UFRJ, 2012; AUSTRALIAN ANTARCTIC DIVISION, 2003).

Figura 4: Imagem Google Earth da região entre a América do Sul e a Península Antártica. Evidenciado, em pontilhado, a localização do arquipélago das Ilhas Shetland do Sul.



Fonte: Google Earth (2014).

As Ilhas Shetlands do Sul compõem um extenso arquipélago na área subantártica, entre 50°S e 60°S de latitude. As maiores ilhas são: Elefante, Clarence, Rei George, Nelson, Robert, Greenwich, Livingston, Snow, Deception, Smith e Low. As ilhas abrigam populações de invertebrados, peixes, mamíferos marinhos e aves, sendo consideradas importantes locais de reprodução desses animais principalmente de aves (HARRIS et al., 2011; McGONIGAL, 2009).

Das seis espécies da superfamília *Pinnipedia* que habitam as águas antárticas, quatro vivem nas ilhas Shetland do Sul e em torno delas: foca-leopardo (*Hydrurga leptonyx*), foca-de-Weddell (*Leptonychotes weddellii*), lobo-marinho (*Arctocephalus gazella*) e elefante-marinho (*Mirounga leonina*) (BRITISH ANTARCTIC SURVEY, 2012). Além dessas espécies de mamíferos, oito espécies de baleias utilizam as águas antárticas no seu ciclo de vida (INTERNATIONAL WHALLING COMMISSION, 2014). A avifauna nas ilhas é composta por 40 espécies diferentes de aves marinhas, entre pinguins, petréis, pombas, andorinhas, trinta-réis, biguás, albatrozes, gaivotas, skuas e outros (AAD, 2010; BRITO, 2009).

O contato entre os animais e os seres humanos na Antártica tem aumentado nos últimos anos devido às bases de pesquisa e o turismo na região (CURRY et al., 2002; HURT et al., 2014; KERRY; RIDDLE, 2009; THOMAZELLI et al., 2010, TIN et al., 2009). A crescente presença humana na Antártica coloca em risco a integridade deste ambiente, aumentando a possibilidade de introdução de espécies exóticas, contaminação por poluentes, acidificação dos oceanos e doenças nas espécies nativas (BRASIL, 2006). Estudos sugerem, por exemplo, que o aumento da temperatura na península antártica cause um declínio no crescimento do krill-antártico (*Euphausia superba*), crustáceo considerado base da cadeia alimentar marinha da região (HILL, 2013). Este declínio pode levar a uma diminuição da população de pinguins-antárticos (*Pygoscelis antarcticus*) e pinguins-de-Adelie (*P. adeliae*). No entanto, o aumento da temperatura na região poderá favorecer o crescimento da população de pinguins-papua (*P. papua*) na península, principalmente associado às alterações nas dinâmicas de gelo (PEÑA, 2014). Esses riscos foram apontados como preocupantes desde a criação do Tratado da Antártica, em 1959, e reforçados já no primeiro encontro do Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (do inglês, *Scientific Committee on Antarctica Research - SCAR*) (KERRY et al., 1998).

2.2.2 Pesquisa na Antártica

A pesquisa na Antártica iniciou-se em 1957, quando o Conselho Internacional de União Científica aprovou a criação do SCAR. Este ano foi estabelecido pela Organização das Nações Unidas como o Ano Geofísico Internacional, o qual motivou a convocação de uma conferência que discutiria o futuro do continente antártico (SECRETARIA DA COMISSÃO INTERMINISTERIAL PARA OS RECURSOS DO MAR, 2012). Em 1959, uma conferência realizada em Washington resultou na assinatura, por parte dos 12 países que dela participaram, do Tratado da Antártica e/ou Protocolo de Madri, que entrou em vigor em 1961 (SECIRM, 2012).

O Tratado estabelece a Antártica como reserva natural, consagrada à paz e à ciência, e dispõe sobre procedimentos a serem seguidos na execução de pesquisas científicas e no apoio logístico às estações antárticas, para a proteção da flora e fauna da região (BRASIL, 2012). Os países que demonstram interesse em atividades de pesquisa científica substancial no continente são reconhecidos como Partes Consultivas nas reuniões do Tratado. Os países que não desenvolvem pesquisa no continente, porém assinaram o Tratado, tornam-se Partes não-Consultivas nas mesmas reuniões (ATS, 2011b).

Desde 1959, 38 países assinaram o Tratado da Antártica. Além dos 12 países iniciais, outros tiveram as atividades científicas no continente reconhecidas e são Partes Consultivas nas reuniões anuais do Tratado (ATS, 2011b). O Brasil aderiu ao Tratado em 1975 e, em 1982, a Comissão Interministerial para os Recursos do Mar (CIRM) implementou o Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). Neste ano o Brasil realizou sua primeira expedição ao continente Antártico e, no ano seguinte, foi aceito como Parte Consultiva do Tratado (SECIRM, 2012).

A Estação Comandante Ferraz (EACF) foi inaugurada em 6 de fevereiro de 1984 (UFRJ, 2012), na Baía do Almirantado (62°23' S e 58°27' W), na Ilha Rei George, a maior das ilhas do arquipélago Shetland do Sul (SCAR, 2008). As atividades científicas brasileiras na Antártica passaram a ser desenvolvidas na EACF, e em três refúgios localizados nas Ilhas Shetland do Sul: Elefante, Nelson e Rei George. Atualmente, as atividades também são realizadas à bordo dos navios de Apoio Oceanográfico 'Ary Rongel' e Polar 'Almirante Maximiano', ambos pertencentes a Marinha do Brasil e, também, conta com vôos de apoio realizados por aeronaves da Força Aérea Brasileira (UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2012).

Em fevereiro de 2012 um incêndio destruiu 70% das instalações da EACF (MARINHA DO BRASIL, 2012). Na EACF eram desenvolvidas pesquisas relacionadas aos fenômenos atmosféricos, às mudanças climáticas, à biologia marinha e às pesquisas tecnológicas multidisciplinares (BRITO, 2009). No verão de 2013/2014 foi concluída a instalação de Módulos Antárticos Emergenciais (MAE) na Península Keller, Baía do Almirantado, próximo ao local onde estava instalada a EACF. Os MAE são um complexo provisório de módulos que irão abrigar cientistas e militares, a fim de dar continuidade a pesquisa brasileira na região. O projeto da nova estação antártica brasileira está programado para iniciar no próximo verão austral, em novembro de 2014 (SECIRM, 2014).

A continuidade da pesquisa brasileira é condição essencial para que o país mantenha sua condição de Membro Consultivo do Tratado da Antártica (SECIRM, 2012). Desta forma, atualmente as pesquisas brasileiras estão sendo desenvolvidas nos navios da Marinha brasileira, nos acampamentos, nos refúgios de pesquisa instalados nas Ilhas Elefante e Nelson, e nos MAE (SECIRM, 2014).

2.2.3 *Aves marinhas*

As aves marinhas constituem um grupo muito diversificado de espécies que se adaptaram com grande eficiência ao meio marinho. São àquelas que obtêm seu alimento desde a linha de baixa maré, até mar aberto. Apesar dessa amplitude, representam apenas 3,2% de um total de aproximadamente 9970 espécies conhecidas de aves (VON MATTER, 2010).

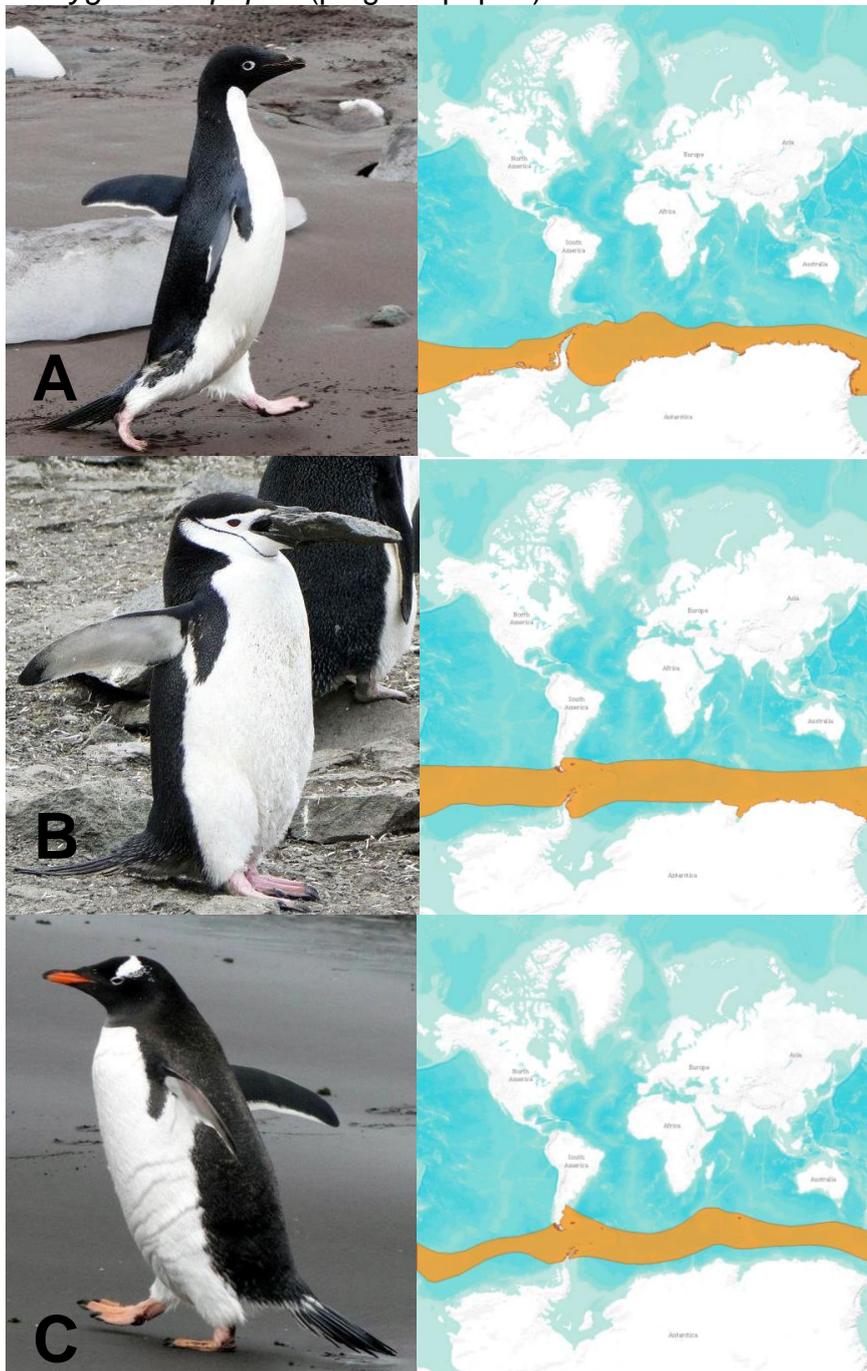
Todas as espécies de aves da Antártica são marinhas. Das 43 espécies que nidificam ao sul da convergência antártica, apenas cinco vivem inteiramente no ambiente terrestre (WOODS et al., 2009). Na Antártica e ilhas subantárticas, as aves marinhas são distribuídas em quatro Ordens: Sphenisciformes (pinguins), Procellariiformes (albatrozes, petréis), Charadriiformes (pomba-antártica, skuas, gaivotas, trinta-réis), e Suliformes (atobás, biguás, fragatas) (NAROSKY; YZURIETA, 2004; SIGRIST, 2013). Destas, algumas espécies têm hábitos migratórios, enquanto outras ficam restritas à região antártica (WOODS et al., 2009). Na próxima sessão, segue uma breve descrição das Ordens e espécies das aves amostradas neste estudo.

2.2.3.1 Ordem Sphenisciformes

Existem sete espécies de pinguins na Antártica, dentre essas, as espécies *Pygoscelis adeliae* (pinguim-de-Adelie), *P. antarcticus* (pinguim-antártico) e *P. papua* (pinguim-papua) (Figura 5) apresentam distribuição circumpolar no hemisfério sul (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014).

Dentre todas as três espécies de pinguins, duas alcançam a maturidade sexual entre dois e três anos (cinco anos para pinguim-de-Adelie) e a partir daí, escolhem seus parceiros reprodutivos (BI, 2014). São monogâmicas, uma vez que 60-90% dos indivíduos mantêm os mesmos parceiros a cada ano. A partir de outubro retornam ao mesmo local de reprodução do ano anterior, formando colônias de diversos tamanhos, para a ovipostura de dois ovos (ANCEL; BEAULIEU; GILBERT, 2013). Barbosa e colaboradores (1997) demonstraram que o sucesso reprodutivo dos pinguins antárticos é maior em colônias grandes, devido a menor perda dos ovos e filhotes por predadores como a skua-subantártica (*Catharacta lonnbergi*), o petrel-gigante-do-sul (*Macronectes giganteus*) e o gaivotão (*Larus dominicanus*). Os pinguins na Antártica alimentam-se de krill, pequenos peixes e lulas. Quando adultos são predados no mar por focas-leopardo e leões-marinhos (AAD, 2014).

Figura 5: Distribuição populacional no mapa das espécies A. *Pygoscelis adeliae* (pinguim-de-Adelie); B *Pygoscelis antarcticus* (pinguim-antártico); C. *Pygoscelis papua* (pinguim-papua).



Fonte: IUCN (2014).

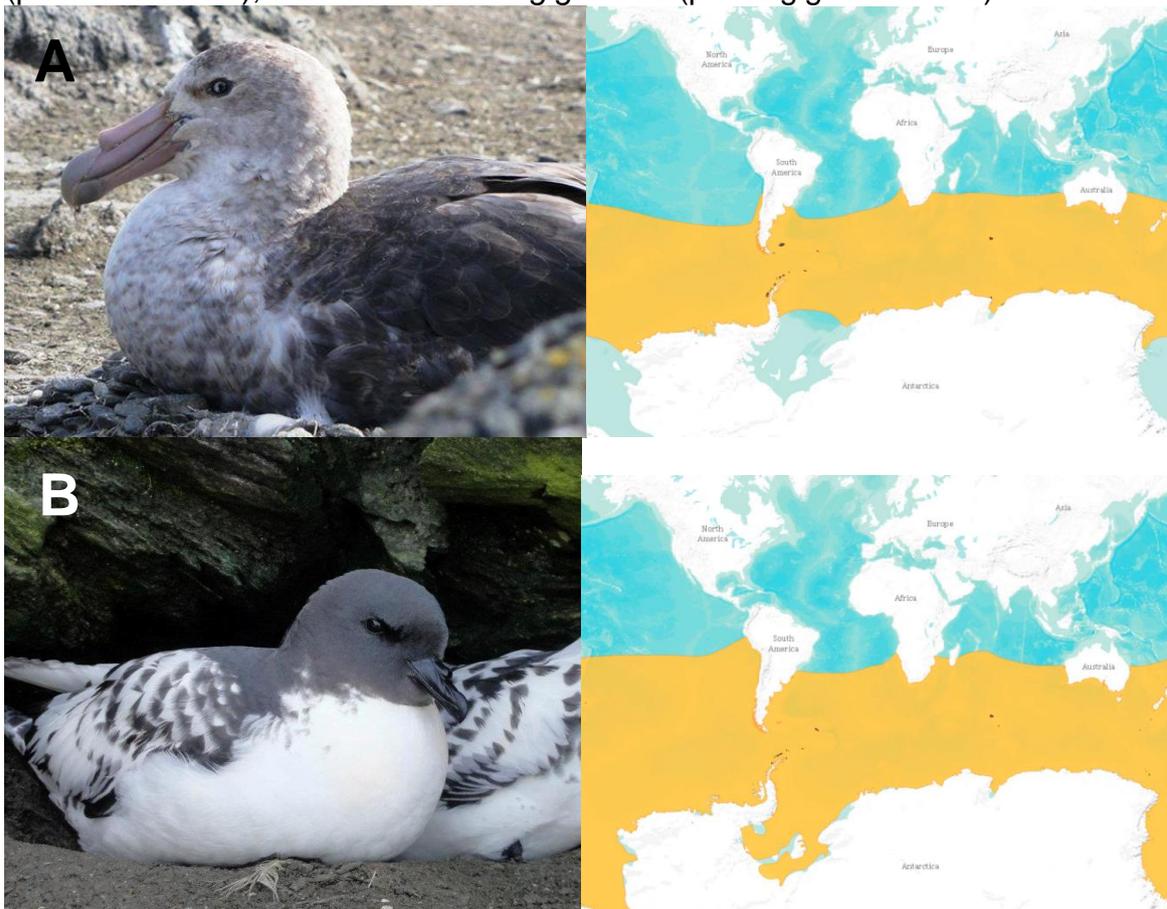
Pinguins-antárticos chegam a pesar 3-4 kg e tem população estimada de oito milhões de indivíduos (os quais se mantêm em zonas com blocos de gelo, quando fora do período reprodutivo) (BI, 2014). Os pinguins-papua têm uma população decrescente de 315 mil pares reprodutivos nidificam na Península Antártica, Ilhas

Shetland do Sul, Ilhas Falkland e Georgia do Sul, e chegam a pesar 7 kg (MARTÍNEZ, 2014; BI, 2014). Os pinguins-de-Adelie podem pesar até 5 kg, e têm população estimada em cinco milhões de indivíduos que nidificam apenas na costa antártica e Ilhas Shetlands do Sul (AAD, 2014; BI, 2014; MARTÍNEZ, 2014).

2.2.3.2 Ordem Procellariiformes

Dentre as diversas espécies de aves da Ordem Procellariiformes na Antártica, as espécies *Daption capense* (pomba-do-cabo) e *Macronectes giganteus* (petrel-gigante-do-sul) (Figura 6) são bastante abundantes. Ambos reproduzem-se na região antártica e subantártica durante o verão austral, no entanto, apresentam características ecológicas distintas (BI, 2014).

Figura 6: Distribuição populacional no mapa das espécies A. *Daption capense* (pomba-do-cabo); e B. *Macronectes giganteus* (petrel-gigante-do-sul)



Fonte: IUCN (2014).

As pombas-do-cabo são pequenas (peso médio de 500g) e alimentam-se de krill, peixes e lula. Durante o inverno austral, chegam a deslocam-se até as Ilhas Galápagos, no Equador (BI, 2014), no entanto, com o início da época de reprodução, em novembro, retornam à região Antártica para a formação de suas colônias, feitas em falésias ou encostas rochosas íngremes (CARBONERAS, 2014). Já os petréis-gigantes-do-sul são aves grandes (peso de até 5 kg), e têm hábitos alimentares oportunistas, incluindo desde carcaças de aves adultas ou filhotes mortos, a ovos, peixes, lulas e krill (AAD, 2014). São mais abundantes em latitudes maiores, embora existam colônias da espécie no Chile, Argentina e Ilhas Falkland (PATTERSON et al., 2008). O período reprodutivo inicia-se em outubro, quando o casal retorna à colônia, para a ovipostura de apenas um ovo. Após esse período, deixam as colônias e vagam pelos oceanos, acompanhando as grandes correntes marinhas ricas em nutrientes na América do Sul, África, Ásia e Oceania (PATTERSON; HUNTER, 2000).

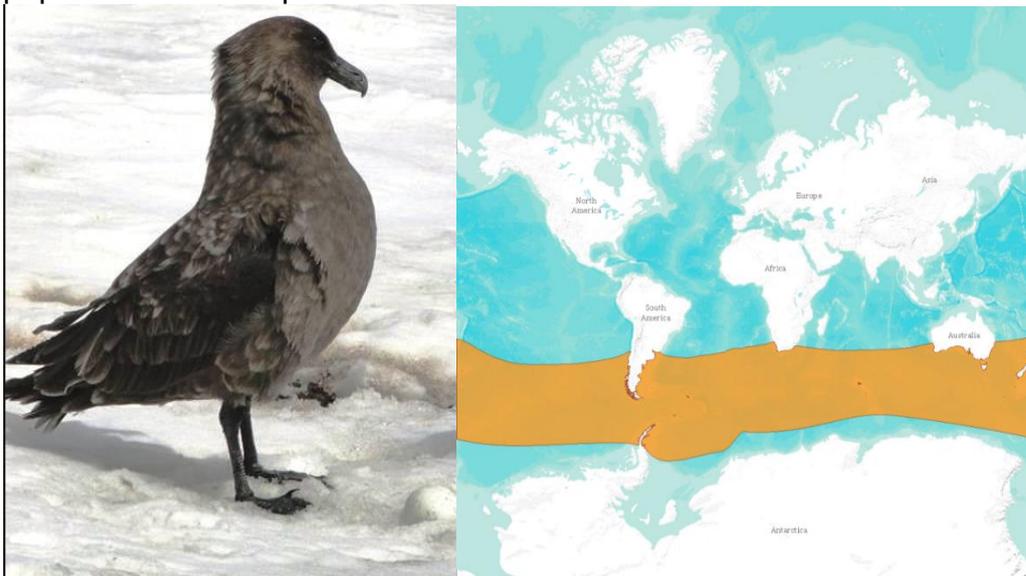
A população de pomba-do-cabo é estimada em dois milhões de indivíduos, enquanto de petrel-gigante-do-sul, 100 mil indivíduos (BI, 2014).

2.2.3.3 Ordem Charadriiformes

Esta Ordem é representada na Antártica por importantes espécies migratórias que se reproduzem nesta região, como o *Larus dominicanus* (gaivotão) e *Sterna vittata* (trinta-réis-antártico) (COSTA et al., 2011). Além dessas, a espécie *Sterna paradisaea* (trinta-réis-do-ártico), tem distribuição circumpolar no hemisfério norte, porém, migra durante o inverno boreal para as altas latitudes do hemisfério sul (EGEVANG et al., 2010). Existem registros da espécie *Chionis alba* (pomba-antártica) no Brasil (TELINO JR et al., 2001; COSTA et al., 2011), Chile e Uruguai (COSTA et al., 2011), bem como aves da espécie *Catharacta lonnbergi* (skua-subantártica), cujo comportamento migratório é pouco definido e já foram registradas no Brasil (COSTA et al., 2011; HURTADO et al., 2012), Argentina e Chile (COSTA et al., 2011).

As skuas-subantárticas têm população estimada em cerca de 15 mil indivíduos e distribuição geográfica na Península Antártica e região subantártica do Oceano Pacífico, Índico e Atlântico (BI, 2014) (Figura 7), onde alguns indivíduos formam colônias (AAD, 2012).

Figura 7: *Catharacta lonnbergi* (skua-subantártica) e sua distribuição populacional no mapa



Fonte: IUCN (2014)

As skuas-subantárticas nidificam a partir de novembro, em áreas elevadas com vegetação ou rochosas próximas às colônias de pinguins. A ovipostura é de dois ovos por ano os quais são defendidos vigorosamente pelo par reprodutivo, contra outras skuas-subantárticas e petréis-gigantes-do-sul que possam preda seus ovos e filhotes. Apresentam características alimentares oportunistas e predam outras aves marinhas e seus filhotes, ovos, moluscos, krill e até pequenos mamíferos (AAD, 2012). Pesam cerca de 3 kg e têm envergadura de até 160 cm (FURNES, 2013).

2.3 Influência em aves marinhas da região subantártica

Muitas das doenças encontradas em outros continentes, mesmo os do sul, provavelmente não serão encontradas na Antártica, devido ao isolamento geográfico deste continente. O continente mais próximo é a América do Sul, a 1500 km de distância, seguido da Oceania, a 3600 km, e da costa sul da África, a 4100 km (KERRY et al., 1998). Alguns autores sugerem que o isolamento possa ter limitado a introdução de doenças às espécies capazes de atravessar o Oceano Antártico (aves e mamíferos) (KERRY; RIDDLE, 2009), ou possa ter isolado doenças restritas às espécies da Antártica (WOODS et al., 2009). A grande maioria dos estudos com doenças virais em aves marinhas na Antártica são relacionados aos vírus Influenza A,

paramyxovírus, birnavírus e arbovírus. Destes, apenas os vírus IA e paramyxovirus não foram isolados em aves da Antártica (KERRY; RIDDLE, 2009).

Doenças em aves marinhas na Antártica também podem ser transmitidas por espécies migratórias as quais são consideradas responsáveis pela transmissão de vários vírus, tais como o Influenza (KERRY et al., 1998). Em temperaturas baixas na água podem determinar a estabilidade deste vírus no ambiente aquático por mais tempo (BROWN et al., 2009a). Segundo Reperant e colaboradores (2010), existe um aumento da ocorrência de infecções por vírus IA de alta patogenicidade em aves selvagens quando a temperatura do ar é baixa (0° a 2 °C). Outra forma de introdução de doenças na Antártica é através do aumento da presença humana no continente, o que coloca em risco a integridade da fauna local, caso esta não tenha resistência imune adequada contra patógenos que possam vir a ser transmitidos (BRASIL, 2006). Apesar de tantas possibilidades, há pouca informação sobre doenças em aves marinhas da Antártica (WOODS et al., 2009).

As populações de aves que vivem em ambientes aquáticos são consideradas reservatórios naturais do vírus IA de baixa patogenicidade (OLSEN et al., 2006; REED et al., 2003; WOODS et al., 2009), enquanto as espécies migratórias são consideradas dispersoras, resultando na existência de vírus distintos ao redor do mundo (FOOD AND AGRICULTURAL ORGANIZATION OF THE UNITED STATES, 2007; HURT et al., 2014). Devido a isso, grande parte do esforço para compreender esses vírus em populações selvagens tem focado nas espécies aquáticas e migratórias (WOODS et al., 2009).

O primeiro indício de que o vírus IA poderia acometer aves marinhas na Antártica foi relatado por Morgan e Westbury (1981). A sorologia positiva para o subtipo H7 foi detectada em pinguins-de-Adelie (*Pygoscelis adeliae*) em colônias da Ilha Peterson, Antártica oriental. Apesar de inédito, os autores não consideraram o achado inesperado, devido ao comportamento migratório de algumas aves da Antártica, como o petrel-gigante-do-sul (*Macronectes giganteus*) que poderia ser a fonte de introdução do vírus no continente (MORGAN; WESTBURY, 1981). Alguns anos depois, novas evidências sorológicas para o vírus IA foram encontradas em soros de pinguins-de-Adelie e de skuas-subantárticas (*Catharacta lonnbergi*) coletados na região do Mar de Ross, desta vez para o subtipo H10 (AUSTIN; WEBSTER, 1993). No entanto, assim como no primeiro estudo, não houve isolamento

viral, e o conhecimento da ecologia do vírus Influenza na Antártica permaneceu escasso (AUSTIN; WEBSTER, 1993).

Em 2004, anticorpos para o subtipo H1, H3, H7 e H9 foram encontrados em diversas aves da Antártica: petréis-gigante-do-sul, pinguins-antártico (*Pygoscelis antarcticus*), pinguins-papua (*Pygoscelis papua*) e skuas-subantárticas, da Península Potter; pinguins-de-Adelie da Península Antártica; e petréis-gigantes-do-sul, da Ilha Nelson, pertencente às Shetland do Sul. Neste mesmo estudo, soros de filhotes de petrel-gigante-do-sul, com mais de 40 dias de vida nascidos na região subantártica, foram positivos para o subtipo H1, o que sugere a possibilidade desses filhotes terem adquirido a infecção localmente. A ausência de anticorpos para os outros subtipos em filhotes pode indicar que os adultos tiveram contato com esses antígenos fora da área amostrada (BAUMEISTER et al., 2004).

Pinguins-papua da Ilha Georgia do Sul (WALLENSTEN ET AL. et al., 2006), skuas-subantárticas amostradas em Vestfold Hills, Antártica Oriental (MILLER et al., 2008), e pinguins-macaroni (*Eudyptes chysolophus*) da Ilha Livingston, Shetlands do Sul, tiveram sorologia positiva para anticorpos do vírus IA (ABAD et al., 2013), em estudos independentes e feitos em locais distantes entre si.

Apesar das diversas sorologias positivas encontradas ao longo dos anos por diferentes estudos, nenhum dos trabalhos realizados conseguiu o isolamento do vírus ou a sequência do seu genoma viral (ABAD et al., 2013; AUSTIN; WEBSTER, 1993; BAUMEISTER et al., 2004; BRIGGS et al., 2003; MILLER et al., 2008; MORGAN; WESTBURY, 1988; WALLENSTEN ET AL., 2006; WEBSTER, 1981). No entanto, recentemente, um estudo realizado com amostras de *swabs* e soro de pinguins-de-Adelie da Península Antártica e Ilha Rei George, Shetland do Sul, conseguiu quatro isolamentos virais, a partir de oito amostras positivas por biologia molecular, além de 43 amostras positivas por sorologia (HURT et al., 2014). O vírus detectado em todos os isolados foi o IA subtipo H11N2, cuja análise filogenética demonstrou ancestralidade com segmentos de genoma de vírus IA do hemisfério norte, sul e vírus Influenza de origem equina. Em análise de relógio molecular, estimou-se que este vírus está entre 49-80 anos atrasado em relação à diversidade dos atuais vírus em circulação. Os achados inesperados do estudo demonstram uma lacuna grande de conhecimento sobre o movimento global dos vírus Influenza, seus hospedeiros e seu potencial epidemiológico na saúde animal e humana (HURT et al., 2014).

Conhecer os patógenos que estão presentes na Antártica é importante tendo em vista as decisões que deverão ser tomadas para a conservação deste ambiente (BARBOSA; PALACIOS, 2009). Além disso, entender quais os subtipos prevaescentes de vírus Influenza presentes nas populações de aves, bem como suas características patogênicas e antigênicas, permitem o estabelecimento de melhores medidas de controle no futuro (FAO, 2007; SOARES et al., 2005).

3 OBJETIVOS

1. Detectar a presença do vírus Influenza A em aves marinhas da região subantártica, utilizando amostras de *swab* orotraqueal e cloacal das aves, seguido de caracterização molecular dos vírus encontrados por isolamento viral, sequenciamento e análise filogenética viral.
2. Verificar a circulação viral do vírus Influenza A em aves marinhas da região Antártica, utilizando amostras de soro das aves para detecção de anticorpos para o vírus.
3. Correlacionar os resultados obtidos às características ecológicas das aves marinhas e migratórias da região subantártica, e discutir a relação destas com os vírus encontrados.
4. A partir dos resultados obtidos, gerar recomendações para a vigilância do vírus Influenza A na Antártica.

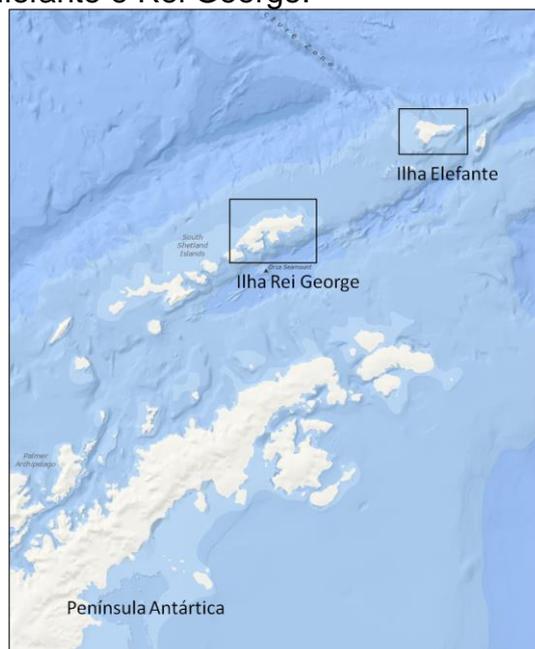
4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Expedição à Antártica

O Laboratório de Virologia Clínica e Molecular (LVCM) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) trabalha em colaboração com o Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos da Universidade do Vale do Rio do Sinos (LOAM-UNISINOS), o qual está vinculado ao Programa Antártico Brasileiro pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq processo nº 574018/2008-5).

Dessa forma, entre dezembro de 2010 e fevereiro de 2013, três expedições à Antártica foram realizadas em duas ilhas do arquipélago Shetland do Sul: Ilha Elefante e Ilha Rei George (Figura 8). As expedições tiveram duração variável nos três anos: de 20/12/2010 a 27/01/2011 (38 dias); 27/10/2011 a 08/12/2011 (42 dias); e 29/10/2012 a 08/01/2013 (71 dias). Para a chegada aos pontos de coleta na ilha Rei George foi necessário a utilização de botes, pertencentes à Marinha do Brasil, e disponível de acordo com o cronograma das atividades de pesquisa na Estação Antártica Comandante Ferraz.

Figura 8: Mapa de localização das Ilhas Elefante e Rei George.



Fonte: Google Earth (2014).

4.1.1 Ilha Elefante

A Ilha Elefante (61°08'S; 55°07'W) está localizada a nordeste do arquipélago Shetland do Sul (McGONIGAL, 2009). O local de estudo foi escolhido para as coletas, porque a ilha é ponto de nidificação de aves marinhas, reprodução de focas e elefantes-marinhos durante o verão austral. Na região da ilha chamada Stinker Point (61°21'S; 55°20'W) existem diversas colônias de aves as quais determinaram esta região como pontos de coleta deste estudo (Figura 9).

Figura 9: Mapa da Ilha Elefante e da região de Stinker Point, evidenciada pelo ponto em vermelho, local da ilha onde foram realizadas as coletas das amostras deste estudo.

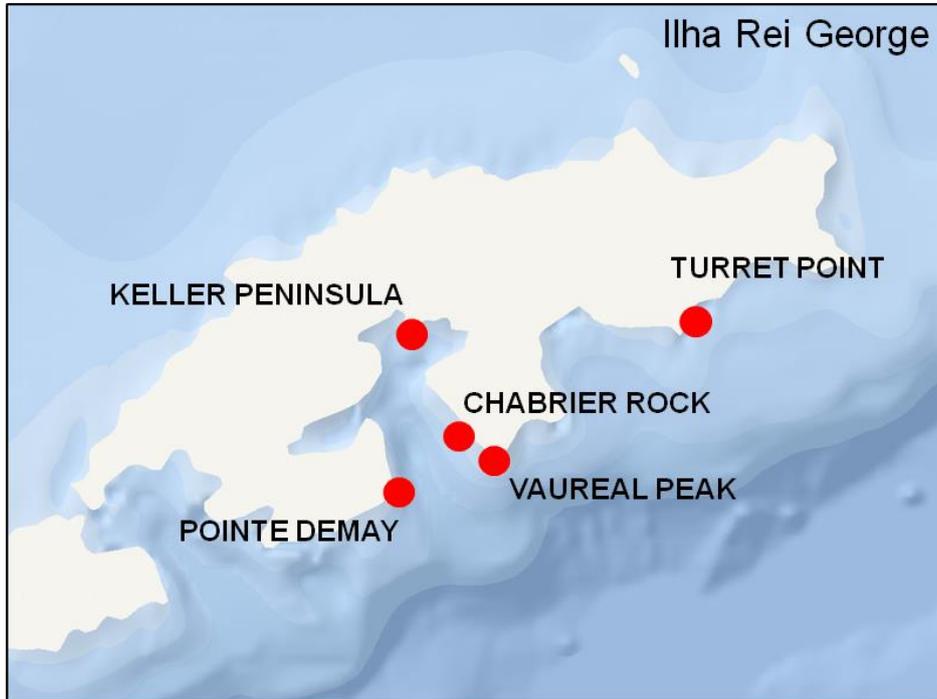


Fonte: Google Earth (2014).

4.1.2 Ilha Rei George

A Ilha Rei George (62°23'S; 58°27'W) é a maior das ilhas do arquipélago das Shetland do Sul. A escolha dos pontos de coleta nesta ilha foi feita de acordo com a presença de colônias de aves marinhas (Figura 10).

Figura 10: Mapa da Ilha Rei George, evidenciando os locais região onde foram realizadas as coletas das amostras deste estudo, pelos pontos em vermelho.



Fonte: Google Earth (2014).

4.2 Captura das aves, coleta e armazenamento do material biológico

A captura das aves e a coleta de material biológico foram realizadas mediante autorização emitida pelo Ministério do Meio Ambiente ao Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). As atividades foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), do ICB da USP (CEUA-ICB-USP n° 133, fls 135, livro 02).

O critério de seleção para a captura das aves foi por conveniência e aleatório. A captura foi feita de forma manual, com imobilização física das aves, realizada pela aproximação de apenas um pesquisador às colônias e aos ninhos. A ave capturada era então transferida para um local distante da colônia, onde os procedimentos de coleta de material foram iniciados. Todas as aves capturadas foram identificadas e anilhadas (exceção da Ordem Sphenisciformes) com anilhas de alumínio fornecidas pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação das Aves Silvestres (CEMAVE/ICMBio).

A coleta das amostras foi realizada por pesquisador em uso dos equipamentos de proteção individual, para evitar a transmissão de possíveis patógenos e contaminação das amostras. Foi realizada a identificação e biometria da ave, feita

pela equipe de ornitólogos coordenados pela Prof. Dra. Maria Virgínia Petry. Em seguida, as amostras biológicas provenientes de material cloacal e orotraqueal de cada indivíduo foram realizadas com o uso de *swabs* estéreis (Figura 11), em formato de duplicata (ou seja, duas amostras para cada ave). Em cada criotubo foi inserido um *swab* orotraqueal e outro cloacal. O meio de transporte para vírus foi feito de acordo com WALLENSTEN e colaboradores (2007) (2.000 unidades de penicilina G, 2,5 µg de estreptomicina, 6 µg de gentamicina, 25 µg de fungizona, 1,0% de albumina bovina, 20% de glicerina), em volume de 500 µL por criotubo.

Figura 11: Coleta de *swab* orotraqueal (A) e cloacal (B) em *Pygoscelis papua* (pinguim-papua).



Para a Ordem Sphenisciformes, o sangue foi coletado da veia metatársica medial, enquanto nas outras aves a coleta foi feita pela veia braquial (Figura 12). Em todas as aves a coleta foi realizada com uso de seringas e agulhas esterilizadas e o volume de sangue foi de até 1% (p/v) em relação ao peso da ave (CAMPBELL, 1994). Ao final do dia de campo, todas as amostras de sangue foram centrifugadas a 800 G por 7 minutos para a retirada do soro que foi devidamente identificado em criotubo.

Figura 12: Coleta de sangue em indivíduo da Ordem Sphenisciformes (A), e em *Catharacta lonnbergi* (skua-subantártica) (B).



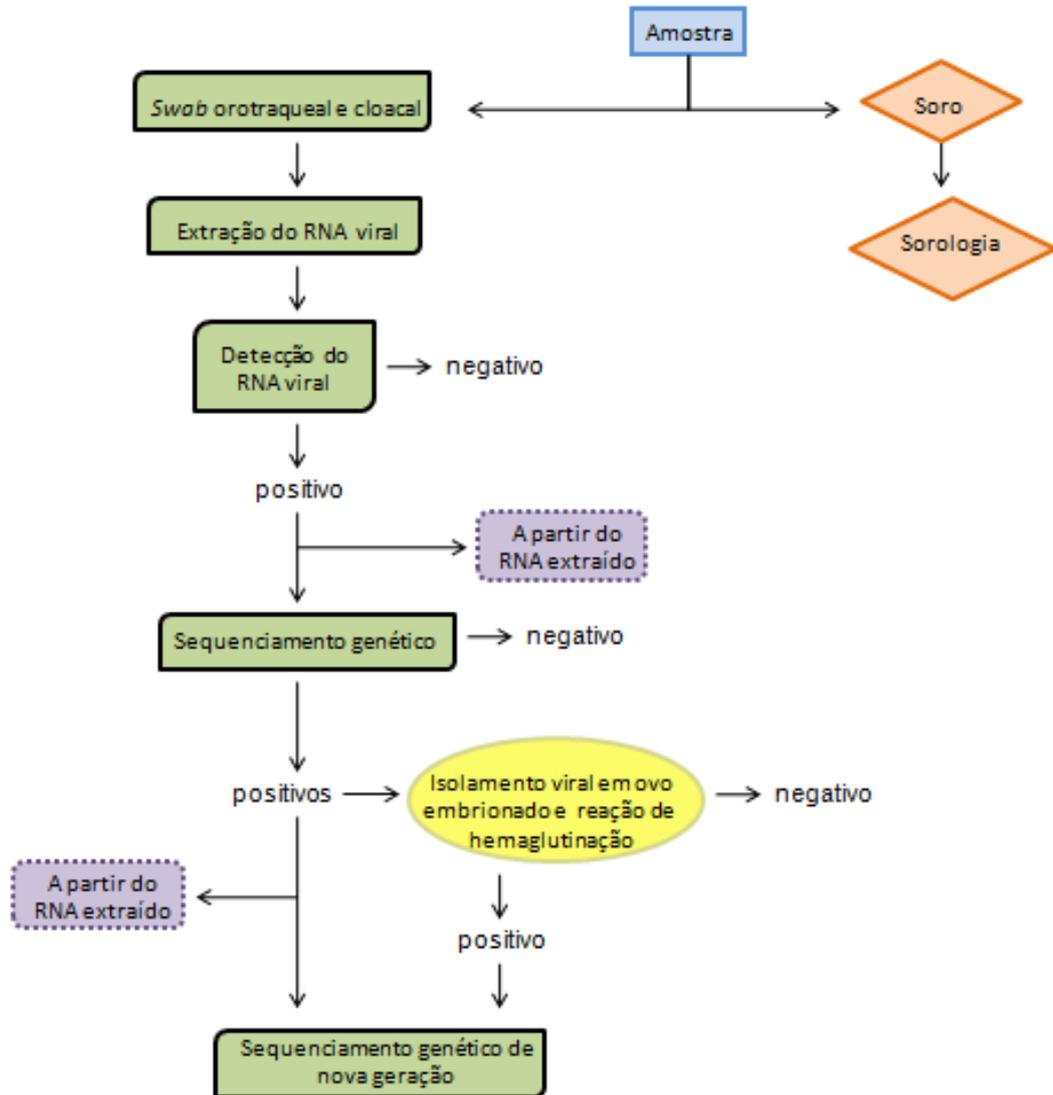
Todas as amostras foram identificadas e as informações descritas na ficha de cada animal. Ao final do dia de campo, todas as amostras foram acondicionadas em nitrogênio líquido e mantidos neste até a chegada ao LVCM-ICB-USP. Ao chegarem ao laboratório as amostras foram armazenadas em ultra-freezer (-70 °C), até o início dos procedimentos laboratoriais.

4.3 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais (Figura 13) de extração de material genético viral, detecção viral, sequenciamento genético de Sanger e a sorologia foram realizadas no Laboratório de Biossegurança nível 3+ (BSL3+), "Prof. Dr. Klaus Eberhard Stewien" e no Laboratório de Biossegurança nível 2 (BSL2), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo (ICB-USP). Os testes para isolamento viral foram realizados pelo Sr. David Walker na *Division of Virology* do *Department of Infectious Diseases*, no *St. Jude Children's Research Hospital*, em Memphis, Tennessee, EUA. O sequenciamento genético de nova geração – *Ion Torrent* foi realizado pelo Dr. Jansen de Araújo e pelos técnicos de laboratório Srs. Ricardo Dalla Costa, Eduardo Castan e Sra. Beatriz Pinto, no Centro de Treinamento da empresa *Life Technologies*, em São Paulo.

Os protocolos laboratoriais utilizados neste estudo seguiram as recomendações das autoridades mundiais em pesquisa dos vírus Influenza A (FAO, 2007; WHO, 2011).

Figura 13: Fluxograma de todas as análises laboratoriais realizadas neste estudo.



4.3.1 Sorologia

As amostras de soro foram testadas pelo método sorológico de Ensaio Imunoenzimático indireto competitivo (cELISA), utilizando-se o *IDEXX AI MultiScreen Ab Test Kit*, conforme as instruções do fabricante (IDEXX Laboratories Inc., Maine, Estados Unidos). As lavagens da placa de cELISA foram feitas mecanicamente pelo aparelho *Labsystem Well Wash 4*, conforme as instruções do fabricante (*Uniscience*); e a leitura dos resultados realizou-se no espectrofotômetro de placa *Multiskan EX (Labsystems)* também conforme as instruções da mesma.

Primeiramente, duas diluições foram realizadas: um volume de 15 µL do soro de cada amostra com 135 µL do diluente, *Sample Diluent*; e 20 mL de solução de lavagem, *10X Wash Concentrate*, com 270 mL de água ultra-pura. Ambas as diluições foram deixadas à temperatura de 25 °C por 10 minutos e, em seguida, homogeneizadas para dissolver qualquer precipitado. Foram distribuídos na placa de cELISA 100 µL da diluição do soro de cada amostra, além do mesmo volume dos controles positivo e negativo em duplicata, e a placa foi incubada a 25 °C por 60 minutos (ligação entre o antígeno do vírus IA – proteína viral NP - impregnado na placa e os anticorpos presentes no soro da amostra).

Após essas etapas, a placa foi lavada quatro vezes com 350 µL de solução de lavagem diluída, no aparelho *Labsystem Well Wash 4*, e foi adicionado em cada poço um volume de 100 µL do conjugado anti-IA, *HRPO Conjugate*. A placa foi incubada a 25°C por 30 minutos (ligação entre o conjugado e os antígenos). Outras quatro lavagens foram realizadas com solução diluída, pelo mesmo aparelho e, em seguida, foi distribuída 100 µL de solução de substrato, *TMB Solution*, em todos os orifícios da placa. Nova incubação foi realizada à 25 °C por 15 minutos (adesão do substrato ao conjugado e formação de coloração). A reação foi paralisada após o volume de 100 µL de *Stop Solution* ser adicionado.

A absorbância da coloração foi imediatamente medida no espectrofotômetro de placa *Multiskan EX*, com comprimento de onda entre 550-650 nm. De acordo com os cálculos indicados pelo fabricante (Quadro 2), os valores de absorbância ≥ 0.5 foram considerados negativos, enquanto aqueles $< 0,5$, positivos.

Quadro 2 – Cálculos para interpretação dos resultados da sorologia

Média de absorbância dos controles negativos (MCN)
Média de absorbância dos controles positivos (MCP)
Coeficiente A/N = $\frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{MCN}}$
Coeficiente A/N ≥ 0.5 Amostra NEGATIVA
Coeficiente A/N < 0.5 Amostra POSITIVA

4.3.2 Extração de RNA viral

Para a extração do material genético viral nas amostras em *swab*, utilizou-se o *MagMAX™-96 Total RNA Isolation kit*, e o aparelho *MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor*, conforme as instruções do fabricante (Life Technologies, Nova Iorque, Estados Unidos).

A cada poço da placa foram adicionados 130 µL de solução de lise, *Lysis/Binding Solution*, 10 µL de solução potencializadora, *Lysis/Binding Enhancer*, 10µL de solução magnética para RNA, *RNA Binding Beads*, e 100 µL de amostra. O RNA da amostra se liga às contas presentes na solução magnética, e a extração ocorre à medida que este é purificado através de diversas lavagens. O aparelho da *Applied Biosystems®* realizou mecanicamente as lavagens por etapas: duas lavagens utilizando 150 µL de solução de limpeza, *Wash Solution 1*, em cada poço, sob agitação de 900 G por 2 minutos; duas lavagens com 150 µL de *Wash Solution 2* em cada poço, sob agitação de 900 G por 2 minutos; uma lavagem com 75 µL de tampão de eluição, *Elution Buffer*, em cada poço, sob agitação de 900 G por 3 minutos. Este último separa o RNA aderido ao reagente magnético.

A placa de extração final foi colocada sob uma base magnética, para que nenhum reagente metálico ficasse incorporado ao RNA extraído, este foi transferido para um microtubo livre de enzimas que catalisam a hidrólise do RNA, as RNAases, e mantido em ultra-freezer (-70 °C) até a etapa de detecção viral.

Como controle positivo das reações foi incluída uma amostra de vírus Influenza A proveniente do isolamento em ovo embrionado, e inativado com beta-propiolactona, proveniente do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e cedido pela Dra. Liana Brentano. Como controle negativo foi usado água ultra-pura.

4.3.3 Detecção do RNA viral

Para a detecção das amostras foi utilizada o *AgPath-ID AIV-Matrix Gene Reagent kit*, e o aparelho *Real Time ABI 7300 PCR System*, conforme as instruções do fabricante (*Applied Biosystems®*, Nova Iorque, Estados Unidos). A metodologia utilizada foi de *One Step Real Time RT-PCR*.

Em cada poço foram adicionados: 12.5 µL de tampão, *2x RT-PCR Buffer*; 1.0 µL de iniciador específico para o gene da Matriz viral de Influenza A, e sonda com fluorescência FAM também específica para o mesmo gene, *25x AIV-Matrix Primer/Probe Mix*; 0.2 µL de controle endógeno do kit, *Xeno™ RNA Control* (diluído na concentração 1:10); 1.0 µL de enzima RT e TaqDNAPolimerase, *25x RT-PCR Enzyme Mix*; 1.67 µL de potencializador da reação, *Detector Enhancer*; e 8.63 µL do RNA extraído da amostra.

Em seguida, a microplaca com o volume de 25 µL em cada poço foi colocada no aparelho da *Applied Biosystems®*. As condições utilizadas foram as seguintes: temperatura inicial de 45 °C por 10 minutos (para a transcrição reversa da enzima RT, e formação de DNA complementar, cDNA, a partir do RNA viral); seguida de 95 °C por 10 minutos (inativação da enzima RT e ativação da enzima TaqDNAPolimerase), seguidos de 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação da dupla hélice do cDNA) e 60 °C por 45 segundos (amplificação do cDNA pela TaqDNAPolimerase, e coleta dos dados de fluorescência). O pareamento dos iniciadores (*Primers*) e da sonda (*Probe*) específicos foi realizado na descida da temperatura de 95 °C para 60 °C.

Para verificar a confiabilidade da reação foram utilizados controles endógenos do *kit*, marcados com fluorocromo VIC, e para a detecção do vírus Influenza foram utilizados marcadores com fluorocromo FAM. A fluorescência da sonda é liberada apenas quando há amplificação do cDNA pela enzima TaqDNAPolimerase. Assim, durante os ciclos de amplificação (CT), a emissão de fluorescência é aumentada de forma exponencial à medida que o cDNA viral é amplificado.

A leitura da fluorescência dos produtos amplificados foi realizada no mesmo equipamento de *Real Time ABI 7300 PCR System*, com auxílio do programa de computador *7300 System SDS*, ambos da empresa *Applied Biosystems®*. O *threshold*, que é definido como o ponto de corte entre as amostras positivas e negativas de acordo com a fluorescência emitida por cada amostra, foi definido automaticamente pelo programa, mas ajustado para a fase exponencial da reação, quando necessário.

4.3.4 Sequenciamento genético

As amostras positivas para o vírus Influenza A pela técnica de *One Step Real Time RT-PCR* foram sequenciadas, visando confirmar a presença do gene da proteína de Matriz viral do vírus IA. O RNA viral extraído dessas amostras foi transcrito a um DNA complementar (cDNA) viral, pela técnica de Transcriptase Reversa (RT); amplificados pela técnica tradicional de Reação de Polimerização em Cadeia (PCR); purificados; e, por fim, sequenciados.

4.3.4.1 RT-PCR

Para a RT, utilizou-se microplaca de 96 poços, o *Superscript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR kit*, e o aparelho *GeneAmp PCR System 9700 thermocycler*, conforme as instruções do fabricante (*Applied Biosystems®*). Para cada 8 µL de amostra do RNA extraído foram utilizados: 1 µL de iniciador inespecífico, *Random Primer*; 1 µL de bases de nucleotídeos livres, *10 mM dNTP Mix*; 2 µL de tampão, *10X RT Buffer*; 4 µL de 25 mM MgCl₂; 2 µL de 0.1M DTT; 1 µL de *RNAaseOUT*, inibidora da degradação de RNA; e 1 µL da enzima RT, *Superscript*. Para que a reação aconteça, a placa contendo 20 µL do homogeneizado em cada poço, foi levada ao aparelho da *Applied Biosystems®*, nas seguintes condições: 22 °C por 10 minutos (pareamento do iniciador inespecífico, *Random Primer*, ao RNA viral), 50 °C por 50 minutos (síntese de cDNA), 85 °C por 5 minutos (paralisar a reação), e, por fim, 4 °C até a retirada da microplaca do aparelho.

Para a PCR, utilizou-se a mesma microplaca de 96 poços e parte do *kit* utilizado na reação de RT, além do *PlatinumTaqDNA Polymerase* e do aparelho *GeneAmp PCR System 9700 thermocycler*, utilizados conforme as instruções do fabricante (*Applied Biosystems®*). Para cada 5 µL de cDNA viral, foram adicionados: 5 µL de tampão, *10x PCR Buffer*; 1 µL de nucleotídeos livres, *10 mM dNTP Mix*; 1,5 µL de 50 mM de MgCl₂; 1 µL de 10 µM de cada iniciador específicos, *Primer forward* e *Primer reverse*; 0,3 µL de TaqDNAPolimerase, *Platinum Taq DNA Polymerase*; e 35,2 µL de água ultra-pura. As condições utilizadas no aparelho da *Applied Biosystems®* foram: 95 °C por cinco minutos (desnaturação do cDNA e ativação das enzimas), seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 45 segundos (desnaturação do cDNA e ativação das enzimas), 54 °C por 45 segundos (pareamento dos iniciadores específicos), e 72 °C

por 45 segundos (amplificação do cDNA pela TaqDNAPolimerase). Após os ciclos, a reação foi paralisada a 72 °C por sete minutos e, por fim, mantida a 4 °C até a retirada da microplaca do aparelho.

Para a amplificação de alguns dos genes da proteína de Matriz viral foram utilizados iniciadores (*Primers*) específicos: o *Primer forward* e o *Primer reverse* (Quadro 3), que amplificam uma sequência de 245 pb do gene da Matriz viral. A reação ocorre nos dois sentidos da fita do cDNA e o fragmento escolhido é amplificado.

Quadro 3- Sequências dos *primers* utilizados na PCR para a proteína de Matriz.

Nome do Primer	Sentido	Sequência	Posição no genoma
M52C	<i>Forward</i>	5'-CTTCTAACCGAGGTCGAAACG-3'	52-73
M253R	<i>Reverse</i>	5'-AGGGCATTGGACAAACGTCT-3'	253-275

Como controle positivo das reações foi incluída a mesma amostra de vírus Influenza A utilizada na extração viral; como controle negativo foi usado água ultra-pura.

Os produtos amplificados foram mantidos em freezer -20 °C até o dia seguinte, quando foram utilizados na Eletroforese. A corrida eletroforética foi realizada em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo, por 45 minutos a 150 V. A visualização das bandas foi feita através de trans-iluminador com luz ultravioleta.

4.3.4.2 Purificação dos produtos da PCR

Para a purificação dos produtos da PCR e remoção de impurezas foi utilizado *ExoSap-IT (GE)*, da empresa *Affymetrix®* (Affymetrix Inc., Califórnia, Estados Unidos), e o aparelho *GeneAmp PCR System 9700 thermocycler*, da *Applied Biosystems®*. Os protocolos foram seguidos de acordo com as instruções dos fabricantes.

Para cada 5 µL do produto da PCR foram adicionados 3 µL de *ExoSap-IT* e 2 µL de água ultra-pura. O volume total de 10 µL foi encaminhado ao aparelho da *Applied Biosystems®*, para reagir nas seguintes condições: 37 °C por 15 minutos (degradação de iniciadores e nucleotídeos remanescentes), e 80 °C por 15 minutos (inativação da *ExoSap-IT*), e finalização da reação.

Após esta fase, os produtos da PCR, ou seja, os amplificados purificados de DNA viral, foram mantidos em freezer -20 °C até o dia seguinte, para serem utilizados na reação de sequenciamento.

4.3.4.3 Sequenciamento genético - Sanger

Na reação de sequenciamento utilizou-se o *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit - Ampli Taq DNA Polymerase* e o aparelho *GeneAmp PCR System 9700 thermocycler*. Para a segunda purificação utilizou-se o *BigDye X Terminator® Purification kit*, e para a leitura dos nucleotídeos marcados por fluorescência foi utilizado o aparelho *ABI PRISM 3100 DNA Sequencer*, todos conforme as instruções do fabricante (*Applied Biosystems®*).

Para 2 µL do produto da PCR purificado foi utilizado: 2 µL de tampão de sequenciamento, *save money-5X*; 2 µL de reagente de sequenciamento, *BigDye Terminator Ready Reaction Mix*; 3 µL de 1pmol de iniciador, *Primer*; e 1 µL de água estéril. O volume final de 10 µL foi submetido aos ciclos de temperaturas para a reação de sequenciamento, no *GeneAmp PCR System 9700 thermocycler*, nas seguintes condições: 96 °C por um minuto (desnaturação dos produtos amplificados), seguido de 25 ciclos de 96 °C por 15 segundos (desnaturação do amplificado e ativação das enzimas), 50 °C por 15 segundos (pareamento do iniciador) e 60 °C por quatro minutos (amplificação dos produtos, a partir dos nucleotídeos marcados com fluorescência) e, por fim, a temperatura foi mantida a 4 °C, até a retirada da microplaca do aparelho. A reação de sequenciamento foi feita em duplicata, cada uma em um sentido da fita de DNA utilizando-se os mesmos iniciadores específicos da PCR.

Após esta reação, uma nova purificação foi realizada com o *BigDye X Terminator® Purification kit*, para a retirada de reagentes de sequenciamento remanescentes. Para tal, foi necessário adicionar em cada poço de amostra sequenciada um volume de 45 µL de *SAM™ Solution*, a fim de potencializar a reação; e 10 µL de *X Terminator Solution*, para eliminar os resquícios dos reagentes de sequenciamento. Após esta etapa, o volume final foi homogeneizado por 30 minutos e, em seguida, realizada uma breve centrifugação. Apenas o sobrenadante purificado foi, então, utilizado na leitura do sequenciador automático.

A detecção dos nucleotídeos marcados por fluorescência foi realizada no sequenciador automático de *ABI PRISM 3100 DNA Sequencer*. As sequências obtidas

foram comparadas com outras disponíveis no *GenBank* da página do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) no endereço eletrônico: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. A análise e o alinhamento da sequência foram realizados com o uso do programa BioEdit, disponível no endereço eletrônico <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit> (HALL, 1999).

4.3.5 Isolamento viral e Reação da Hemaglutinação

Das amostras positivas para Influenza A pelo método de *One Step Real Time RT-PCR*, aquelas com ciclos de amplificação (CT) abaixo de 37 (STALLKNECHT et al., 2012) foram selecionadas para envio ao Sr. David Walker na *Division of Virology* do *Department of Infectious Diseases*, do *St. Jude Children's Research Hospital*, em Memphis, Tennessee, EUA, a fim de que o vírus fosse isolado em ovo embrionado e, posteriormente, caracterizado. Para o procedimento de inoculação viral em cavidade alantoide de ovos embrionados foram usados ovos embrionados livres de patógenos (SPF) entre 9-11 dias de vida.

Os procedimentos foram realizados de acordo com o protocolo da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011). Primeiramente, os ovos foram examinados em ovoscópio para avaliação da viabilidade de embriões e integridade da casca, bem como para a delimitação da câmara de ar e identificação com o número da amostra correspondente. Após antissepsia e perfuração de um orifício na casca, o volume de 100 µL de amostra foi inoculado na cavidade amniótica e alantóide. Os ovos ficaram incubados em estufa a 35 °C por 72 horas e, em seguida foram refrigerados a 4 °C por 12 horas. Os fluidos alantóicos e amnióticos foram retirados e utilizados para o teste de reação da hemaglutinação e para uma segunda inoculação (segunda passagem) em ovo embrionado. O procedimento foi repetido e, apenas após a terceira inoculação, pode-se reportar a incapacidade de crescimento viral.

Para a reação de hemaglutinação foram realizadas diluições seriadas de amostras (pura; 1:2; 1:4...) e dos controles de hemácias de galinhas previamente lavadas e diluídas em PBS a 0.5%. Para o preparo da placa foi utilizado um estoque de amostra de cerca de 100 µL do líquido alantoide de ovo embrionado inoculado, o qual foi diluído sequencialmente em tampão fosfato-alcalino (PBS). A solução de hemácias de galinha foi adicionada às diluições das amostras e, em seguida a placa foi selada e mantida em temperatura ambiente por 30 minutos. As amostras que

obtivessem resultados positivos, ou seja, ocorrência de hemaglutinação em poços com baixas diluições, a prova seria repetida com novas diluições. O título seria definido pelo inverso da maior diluição de líquido alantóico capaz de apresentar atividade hemaglutinante.

4.3.6 Sequenciamento genético de nova geração

As amostras que geraram sequência para os genes da Matriz viral do vírus Influenza A por sequenciamento genético de Sanger, também foram sequenciadas também pelo método de sequenciamento genético de nova geração – *Ion Torrent*, com os objetivos que todos os segmentos do RNA viral do vírus IA fossem sequenciados. Para tal, todos os segmentos do RNA viral extraído dessas amostras foram: transcritos a um DNA complementar (cDNA) viral, pela técnica de Transcriptase Reversa (RT); amplificados por Reação de Polimerização em Cadeia (PCR); purificados; e, por fim, sequenciados.

4.3.6.1 RT-PCR

Para a RT, utilizou-se tubos eppendorf® de 0,2 mL, o *PathAmp™Flu A Reagents kit*, e o aparelho *GeneAmp PCR System 9700 thermocycler*, conforme as instruções do fabricante (*Applied Biosystems®*). Este *kit* de RT foi desenhado para amplificar os oito segmentos genômicos do vírus Influenza A e, portanto, é composto por enzimas RT e iniciadores (*Primers*) específicos de alto rendimento. Para cada 8 µL de amostra do RNA extraído, foram utilizados: 10 µL de tampão, *2X PathAmp™ FluA RT Buffer*, e 2 µL de enzima RT, *RT Enzyme Mix*. Para que a reação acontecesse, a placa contendo 20 µL do homogeneizado em cada poço foi levada ao aparelho da *Applied Biosystems®*, nas seguintes condições: 45 °C por 1 hora e 95 °C por 1 minuto.

Para a PCR, utilizou-se também tubos eppendorf® de 0.2 mL, parte do *kit* usado na reação de RT, e do aparelho *GeneAmp PCR System 9700 thermocycler*, conforme as instruções do fabricante (*Applied Biosystems®*). Da mesma forma que na RT, a parte do *kit* utilizada na reação de PCR também continha enzimas TaqDNAPolimerase, tampões e iniciadores (*Primers*) de alto rendimento. Para cada 20µL do cDNA viral produto da reação de RT, foram adicionados: 5 µL de tampão, *10x*

Complete Long PCR Buffer; 2 µL de iniciadores, *25X PCR Primer Mix*; 2 µL de TaqDNAPolimerase, *5U/µLSuperTaq plus PCR Enzyme*; e 21 µL de água ultra pura. As condições utilizadas no aparelho da *Applied Biosystems®* foram: 95 °C por quatro minutos (desnaturação do cDNA e ativação das enzimas), seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação do cDNA e ativação das enzimas), 55 °C por 30 segundos (pareamento dos iniciadores específicos), e 68 °C por 2 minutos (amplificação do cDNA pela TaqDNAPolimerase); após os ciclos, a reação foi paralisada a 68 °C por sete minutos.

A corrida eletroforética dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose a 0,8% corado com brometo de etídeo, por 45 minutos a 100 V. A visualização das bandas foi feita utilizando trans-iluminador com luz ultravioleta.

4.3.6.2 Purificação dos produtos da PCR

Para a purificação dos produtos da PCR foram utilizados componentes do *MagMax™ 96Viral RNA Isolation kit*, utilizado na extração do material genético das amostras, e o aparelho *MagMAX™ Express-96 Deep Well Magnetic Particle Processor*. Os protocolos foram seguidos de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems®*).

Para cada 50 µL do produto da PCR, foram adicionados 130 µL de solução de lavagem, *Lysis Binding Solution*; 10 µL de solução magnética para RNA, *RNA Binding Beads*; e 10 µL de água ultra-pura. O cDNA da amostra se liga às contas presentes na solução magnética, e a purificação ocorre através de diversas lavagens. O aparelho da *Applied Biosystems®* realizou mecanicamente as lavagens por etapas: homogeneização sob agitação de 900 G por 3 minutos; lavagem utilizando 150 µL de solução de limpeza, *Wash Solution 2*, em cada poço, sob agitação de 900 G por 1 minuto; retirada do sobrenadante; nova lavagem com 150 µL de solução de limpeza, *Wash Solution 2*, em cada poço, sob agitação de 900 G por 1 minuto; nova retirada do sobrenadante e, após um minuto de pausa para a secagem da solução magnética, adicionou-se 50 µL de água ultra pura em cada poço, para última lavagem sob agitação de 900 G por 3 minutos; seguindo-se da remoção do sobrenadante. Após esta fase, os produtos da PCR, ou seja, os amplificados purificados de cDNA viral foram mantidos em freezer -20 °C até o dia seguinte, para serem utilizados na reação de sequenciamento.

4.3.6.3 Sequenciamento genético de nova geração – *Ion Torrent PGM*

A reação de sequenciamento genético de nova geração foi realizada pela plataforma *Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) sequencer*, de acordo com as instruções do fabricante (*Life Technologies Inc.*). Este tipo de sequenciamento é composto por um protocolo extenso, dividido em etapas e procedimentos complexos, utilizando-se de *kits*, reagentes e aparelhos diferentes. Desta forma, a metodologia será resumidamente apresentada de forma que possa ser reproduzida, caso seja necessário.

Os produtos amplificados dos oito segmentos do vírus IA foram fragmentados por 15 minutos com o *Ion Xpress Plus Fragment Library kit*, e ligados aos adaptadores de código de barra, pelo *Ion Xpress Barcode Adapters 1-96 Kit*, de acordo com o protocolo de ambos. Os fragmentos ligados aos adaptadores (FLA) foram reunidos, purificados e amplificados em PCR de emulsão em óleo, de acordo com o protocolo do *Ion PGM Template OT2 200 Kit*, no aparelho *Ion OneTouch 2 System*, de acordo com o protocolo de ambos. Nesta etapa, os FLA passam a ter o formato de microreatores (*Ion Sphere Particle*) e, apenas desta forma, podem ser aplicados no *chip* de leitura do sequenciador. Foi utilizado o *kit* de sequenciamento *Ion PGM Sequencing 200 Kit v2*, e o *chip* de leitura *Ion 316 Chip kit v2* o qual foi lido pelo aparelho sequenciador *Ion Torrent PGM sequencer* (BOWMAN et al., 2012; DELANGUE et al., 2014; LIFE TECHNOLOGIES, 2014)

As sequências dos genes das glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) geradas foram comparadas com outras existentes no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, utilizando o *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)*, disponível no endereço eletrônico <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Em seguida, as sequências foram alinhadas usando o programa *BioEdit*, disponível no endereço eletrônico <http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit> (HALL, 1999).

Para a construção filogenética foi efetuada uma busca do melhor modelo a ser empregado nas análises utilizando o programa *ModelTest 3.7 (PAUP 4.0b10)* (SWOFFORD, 2002). Os critérios de máxima verossimilhança (ML, sigla em inglês para *maximum likelihood*) evolutiva foram realizados através do programa *PAUP 4.0b10*. A árvore de ML, com as sequências codificadoras para os respectivos genes

da HA e NA, foram geradas através da busca heurística (*heuristic search*) com o algoritmo *neighborn joining*. Para verificar a sustentação de ramos nas topologias das árvores obtidas, foram feitas análises de *bootstrap* com 1000 pseudoréplicas (FELSENSTEIN, 1985). Os valores de *bootstrap* visualizados nas árvores filogenéticas foram geradas pelo programa *FigTree* (RAMBAUT, 2007), e os valores inferiores a 50% foram excluídos.

5 RESULTADOS

5.1 Expedição à Antártica, captura e coleta de material biológico das aves

Entre dezembro de 2010 e janeiro de 2013 foram realizadas expedições às ilhas Elefante e Rei George, Antártica, em conjunto com a equipe do Laboratório de Ornitologia e Animais Marinhos (LOAM) da Universidade do Vale do Rio do Sinos (UNISINOS), através do Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR). O esforço de captura diário em cada uma das expedições foi muito variável (entre três a nove horas), pois dependia das condições meteorológicas instáveis nas áreas de estudo.

Dentre as sete espécies de aves amostradas, três pertenciam à Ordem Sphenisciformes (*Pygoscelis papua*, pinguim-papua; *Pygoscelis antarcticus*, pinguim-antártico; e *Pygoscelis adeliae*, pinguim-de-Adelie); uma da Ordem Charadriiformes (*Catharacta lonnbergi*, skua-subantártica); e duas da Ordem Procellariiformes (*Daption capense*, pomba-do-cabo; e *Macronectes giganteus*, petrel-gigante-do-sul).

Foram amostrados um total de 585 indivíduos (538 da Ilha Elefante, e 47 da Ilha Rei George) dos quais foram coletadas amostras de swabs orotraqueal e cloacal de cada um deles (Tabela 1).

Tabela 1- Distribuição dos indivíduos amostrados com coleta de *swab* por espécie, local e período de captura.

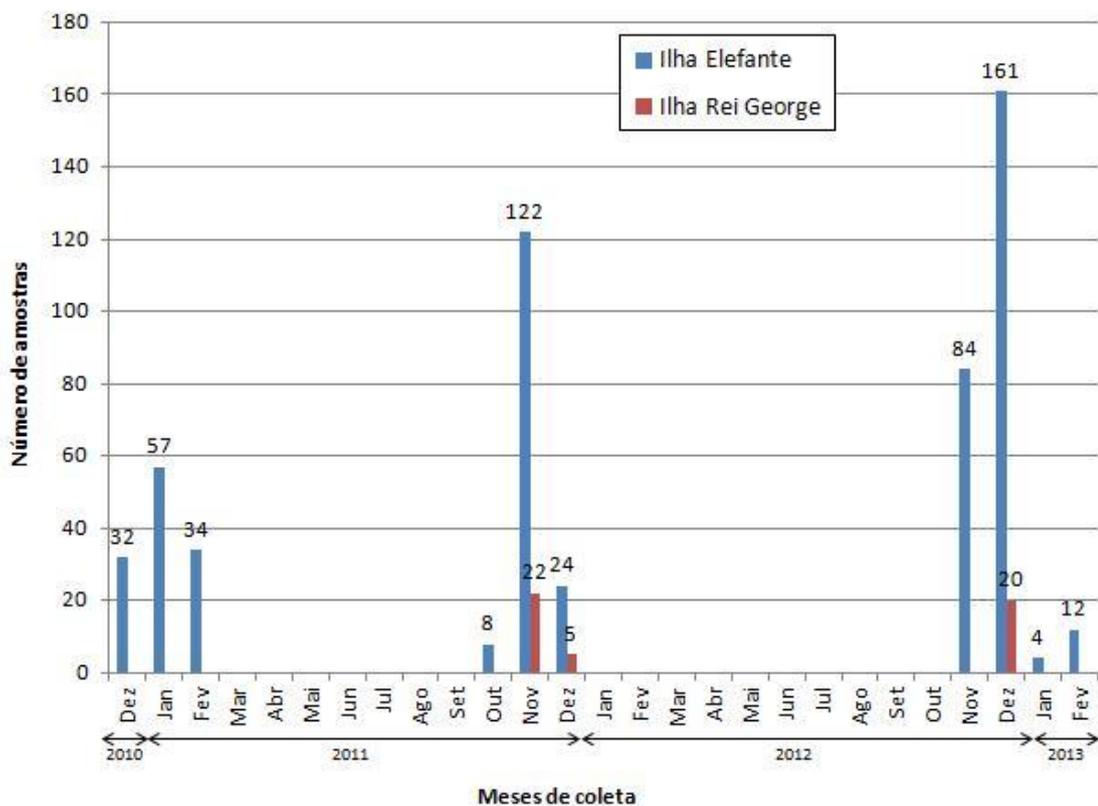
Nome popular	Ilha Elefante			Ilha Rei George		Total
	Verão 2010-11	Verão 2011-12	Verão 2012-13	Verão 2011-12	Verão 2012-13	
pinguim-antártico	22	62	40	-	-	124
pinguim-papua	23	36	111	2	-	172
pinguim-de-Adelie	-	-	-	25	20	45
skua-subantártica	25	24	30	-	-	79
pomba-do-cabo	53	32	30	-	-	115
petrel-gigante-do-sul	-	-	50	-	-	50
	123	154	261	27	20	
	538			47		585

Dentre todas as amostras de swab coletadas, 58% foram de aves da Ordem Sphenisciformes (29% pinguim-papua, 21% pinguim-antártico, e 8% pinguim-de-Adelie); seguida de 28% de Procelariiformes (20% de pomba-do-cabo e 8% petrel-

gigante-do-sul); e 14% da Ordem Charadriiformes, representada pela skua-subantártica.

Dentre o total de indivíduos amostrados com coleta de *swab* na Ilha Elefante, 48% foi do verão 2012-13, seguido de 29% do verão 2011-12; e 23% do verão 2010-11. Na ilha Rei George, 57,5% do total de amostras coletadas de *swab* foi no verão 2011-12, seguido de 42,5% no verão 2012-13 (Figura 14).

Figura 14: Gráfico mostrando a distribuição de indivíduos amostrados com coleta de *swab* nos verões 2010-11, 2011-12 e 2012-13 nas Ilhas Elefante e Rei George.



Foram amostrados um total de 673 indivíduos com coleta de soro (629 provenientes da Ilha Elefante, e 44 da Ilha Rei George (Tabela 2).

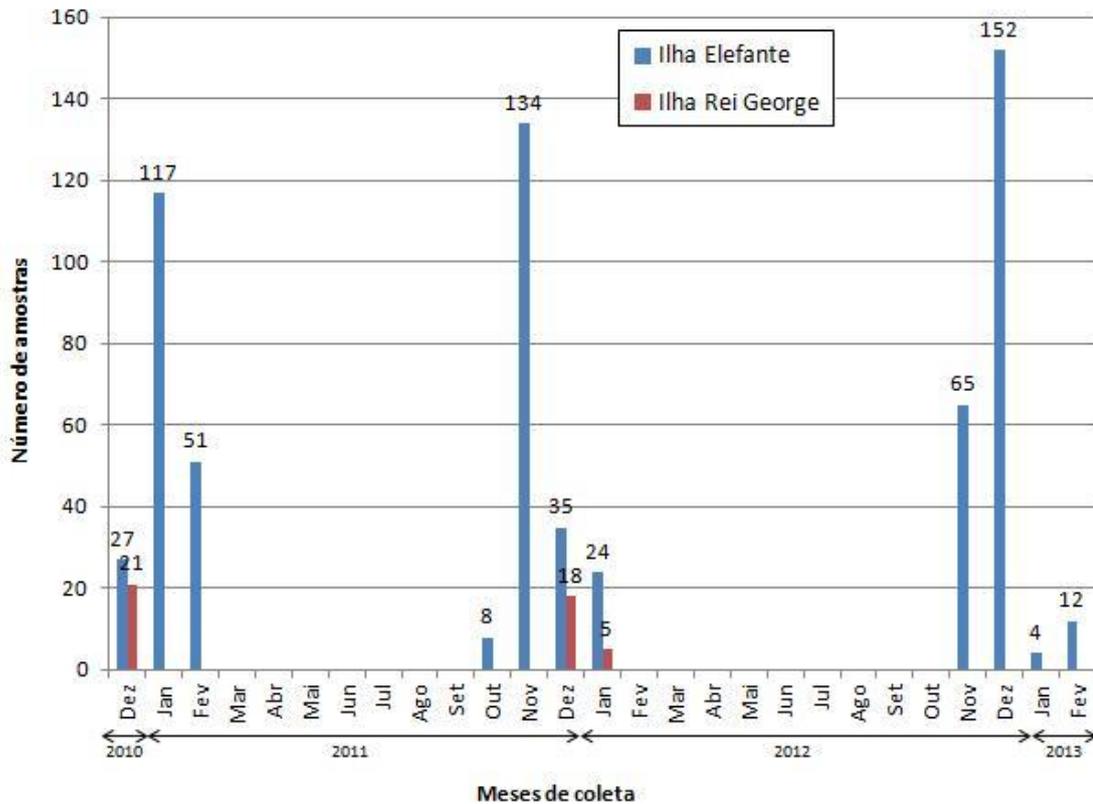
Tabela 2- Distribuição dos indivíduos amostrados com coleta de soro por espécie, local e período de captura.

Nome popular	Ilha Elefante			Ilha Rei George		Total
	Verão 2010-11	Verão 2011-12	Verão 2012-13	Verão 2010-11	Verão 2011-12	
pinguim-antártico	19	33	23	19	-	94
pinguim-papua	17	36	108	1	2	164
pinguim-de-Adelie	-	-	-	1	21	22
skua-subantártica	22	35	30	-	-	87
pomba-do-cabo	35	32	26	-	-	93
petrel-gigante-do-sul	102	65	46	-	-	213
	195	201	233	21	23	673
	629			44		

Dentre o total de indivíduos amostrados com coleta de soro, 45% correspondeu a aves da Ordem Procellariiformes (31% de petrel-gigante-do-sul e 14% de pomba-do-cabo), seguida por 42% da Ordem Sphenisciformes (25% de pinguim-papua, 14% de pinguim-antártico, e 3% pinguim-de-Adelie); e 13% de Charadriiformes (skua-subantártica).

Para as amostras de soro, o perfil de coleta nos verões em cada ilha foi similar. Na Ilha Elefante, o verão de 2012-13 apresentou a maior quantidade de indivíduos amostrados com soro coletado, com 37%; seguido do verão 2011-12, com 32%; e do verão 2010-11, 31%. Na ilha Rei George, o verão de 2011-12 teve 52% do total de amostras de soro coletadas nesta ilha, seguido do verão 2010-11, com 48% (Figura 15).

Figura 15: Gráfico mostrando a distribuição de indivíduos amostrados com coleta de soro nos verões 2010-11, 2011-12 e 2012-13 nas Ilhas Elefante e Rei George.



A maioria das coletas, tanto de swab (92%) quanto de soro (93%), foram realizadas na Ilha Elefante (Figura 14 e 15).

5.2 Análises laboratoriais

5.2.1 Sorologia

Dentre os 673 indivíduos amostrados com coleta de soro, 108 (16%), apresentaram resultados positivos pelo método de ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA) (Figura 16 e APÊNDICE). Destes, 105 (97%) foram provenientes da Ilha Elefante e 3 (3%), da Ilha Rei George.

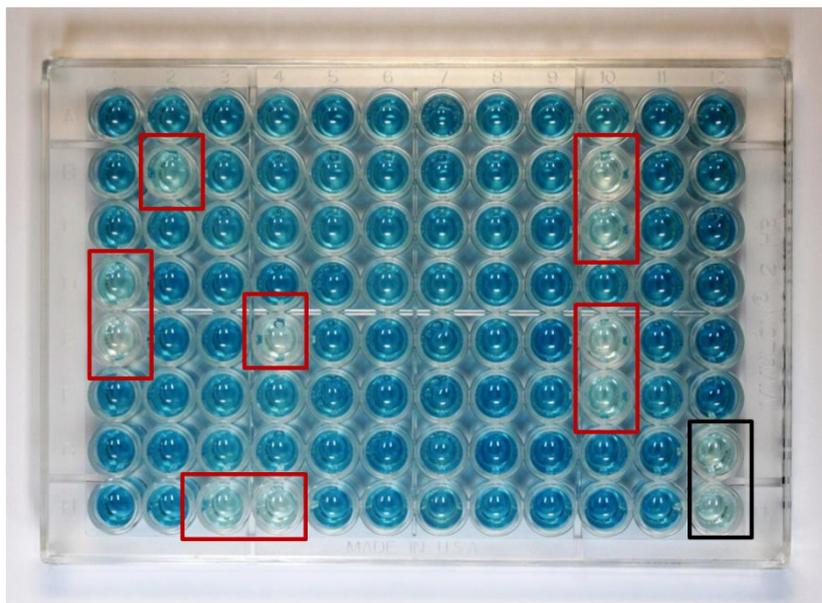


Figura 16: Placa de sorologia por ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA). As amostras positivas, em vermelho, e o controle positivo, em preto.

Na ilha Elefante, três espécimes de skua-subantártica capturadas no verão 2011/12 (AE 457, AE 476 e AE 478), foram recapturados no verão seguinte, 2012/13 (AE 766, AE 769 e AE 770). Em ambos os verões as três skuas-subantárticas foram positivas para a presença de anticorpos para o vírus IA (APÊNDICE).

Das amostras com resultados positivos em ambas as ilhas, Elefante e Rei George, 76 (71%) foram de skua-subantártica, 31 (28%) de pinguim-antártico e uma (0,9%) amostra de pinguim-de-Adelie. Na ilha Rei George, a soroprevalência em pinguins-antártico foi de 10% (2/19), enquanto para pinguins-de-Adelie, foi de 4% (1/22). Na ilha Elefante houve uma soroprevalência de 38% (29/75) em pinguins-antárticos, enquanto para skua-subantártica foi de 87% (76/87).

O verão com maior quantidade de resultados positivos foi o de 2011-12, com 51 (47%) indivíduos com amostras positivas, das quais 50 foram da Ilha Elefante (24 skuas-sub-antárticas e 16 pinguins-antárticos) e, apenas uma da Ilha Rei George (pinguim-de-Adelie). No verão 2010-11 foram encontradas 33 (30%) amostras positivas, das quais 31 da Ilha Elefante (22 skuas-subantárticas e 9 pinguins-antárticos), e duas da Ilha Rei George (pinguins-antártico). Por último, no verão 2012-13, 24 (22%) amostras foram positivas da Ilha Elefante (20 skuas-subantárticas e 4 pinguins-antárticos) (Figura 17 e Figura 18).

Figura 17: Gráfico mostrando a distribuição das amostras positivas na sorologia de acordo com os meses de coleta e as espécies, na Ilha Elefante.

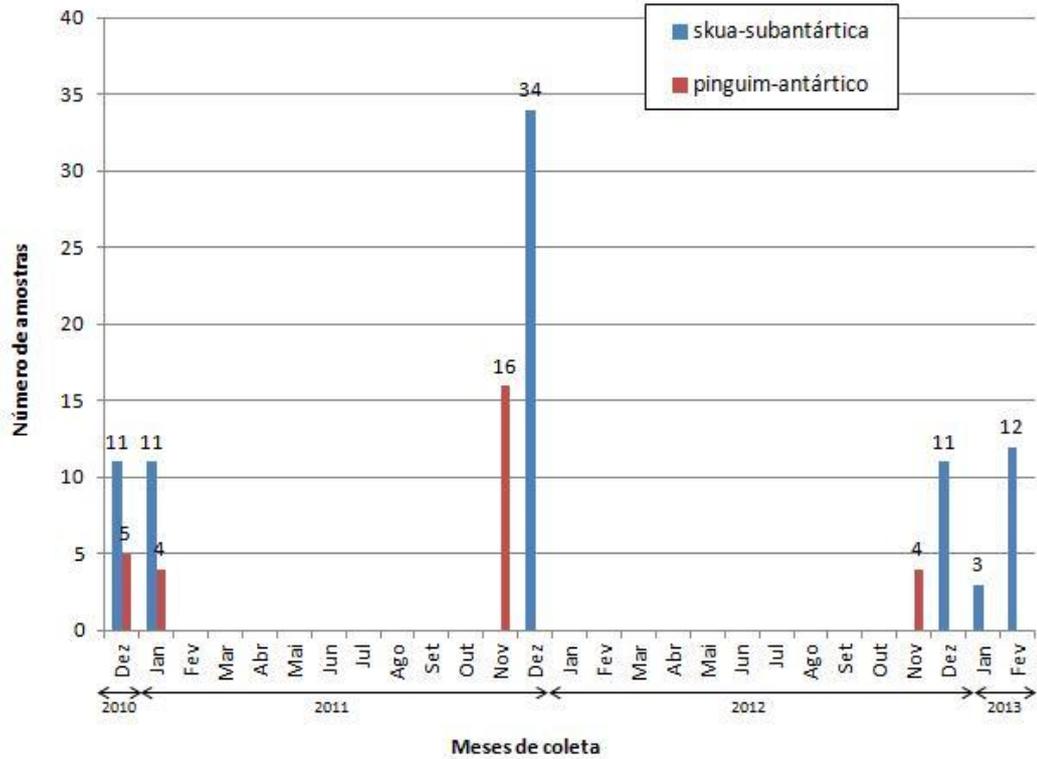
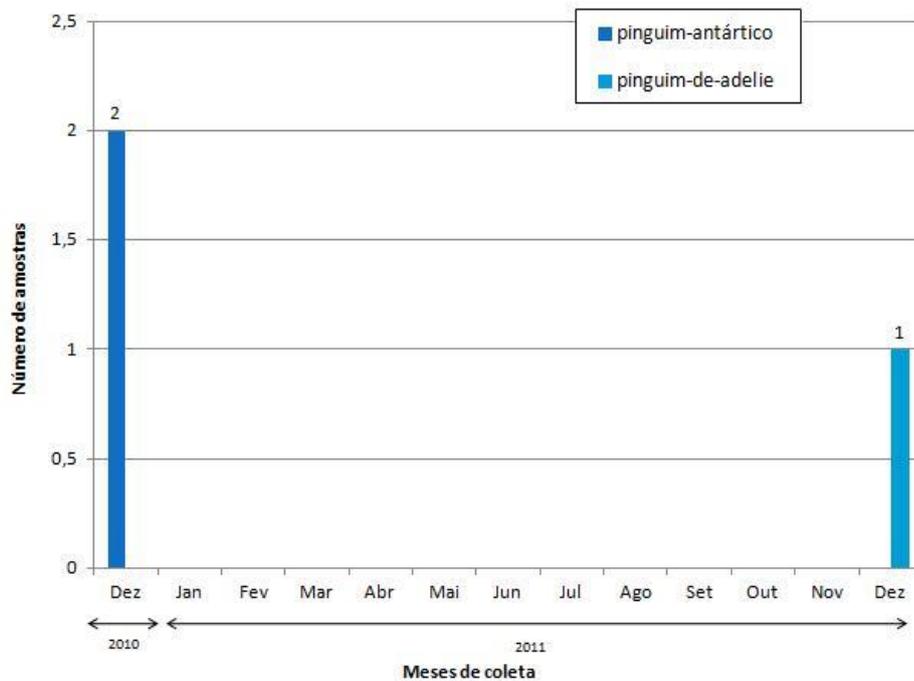


Figura 18: Gráfico mostrando a distribuição de amostras positivas na sorologia de acordo com os meses de coleta e as espécies, na Ilha Rei George.



5.2.2 Detecção viral

Dentre as 585 amostras de *swabs* orotraqueal e cloacal coletadas, 13 (2.2%) apresentaram resultados positivos na detecção viral por *One Step Real Time RT-PCR*. Todas foram provenientes da Ilha Elefante e tiveram detecção da fluorescência em ciclos de amplificação (CT) entre 26 e 43 (média= 38) (Figura 19, Tabela 3).

Figura 19: Curvas de fluorescência das treze amostras positivas e do controle positivo pelo *One Step Real Time RT-PCR*; a linha verde indica o *threshold*.

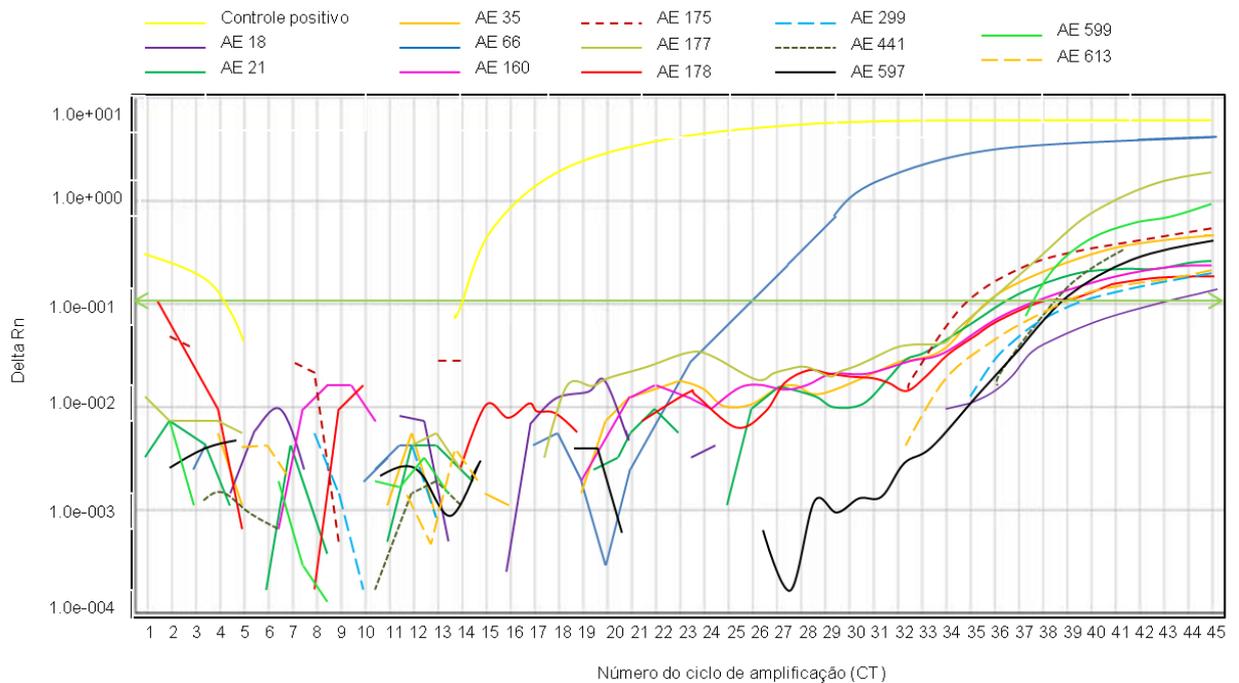


Tabela 3- Detalhes das amostras positivas por *One Step Real Time RT-PCR*.

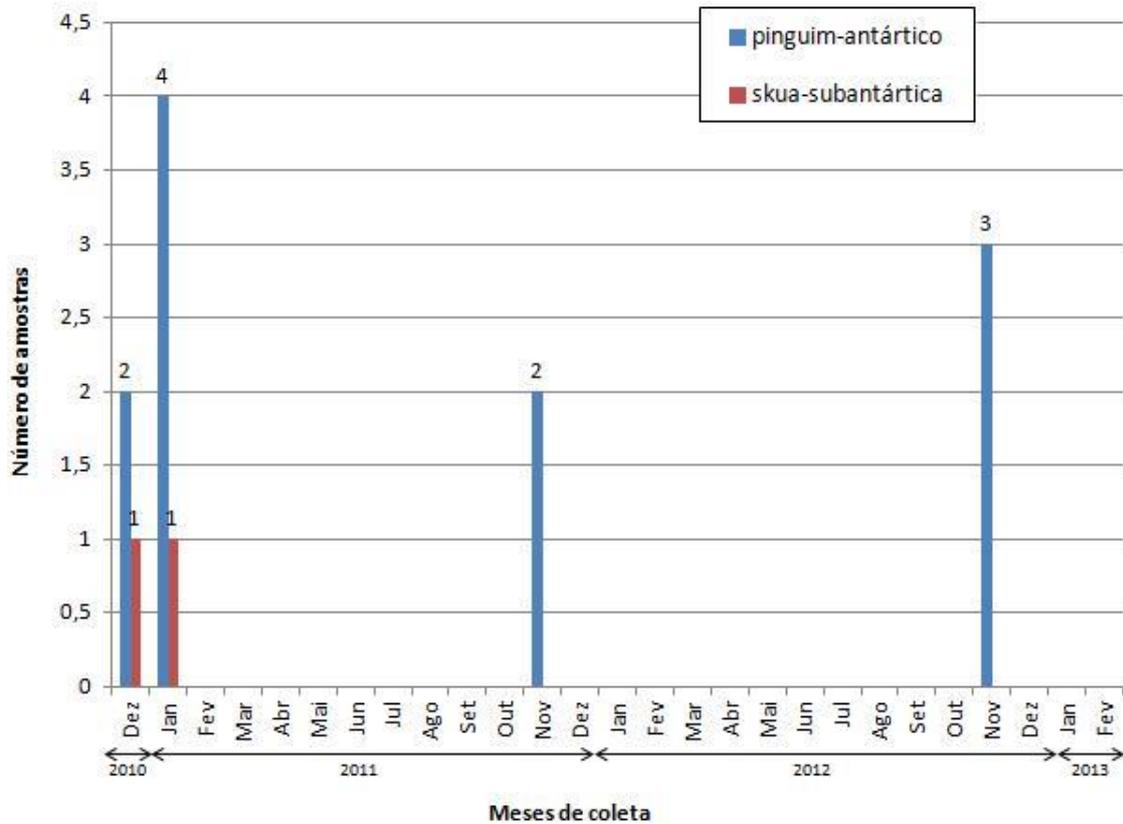
Amostra	Nome popular	Data	Local	CT* (C+ 14)
AE 18	pinguim-antártico	29/12/2010	Ilha Elefante	42
AE 21	pinguim-antártico	29/12/2010	Ilha Elefante	38
AE 35	skua-subantártica	31/12/2010	Ilha Elefante	36
AE 66	skua-subantártica	02/01/2011	Ilha Elefante	26
AE 160	pinguim-antártico	21/01/2011	Ilha Elefante	37
AE 175	pinguim-antártico	23/01/2011	Ilha Elefante	35
AE 177	pinguim-antártico	23/01/2011	Ilha Elefante	36
AE 178	pinguim-antártico	23/01/2011	Ilha Elefante	39
AE 299	pinguim-antártico	01/11/2011	Ilha Elefante	40
AE 441	pinguim-antártico	25/11/2011	Ilha Elefante	38
AE 597	pinguim-antártico	26/11/2012	Ilha Elefante	37
AE 599	pinguim-antártico	26/11/2012	Ilha Elefante	39
AE 613	pinguim-antártico	28/11/2012	Ilha Elefante	39

*CT: ciclos de amplificação; C+ : Controle positivo.

Dentre as amostras positivas, 11 (85%) foram de pinguim-antártico e 2 (15%) de skua-subantártica. Das amostras coletadas de pinguim-antártico, houve uma incidência de 8% (11/124) positivos para esta espécie, enquanto para skua-subantártica, a incidência foi de apenas 2% (2/79).

O verão com maior quantidade de resultados positivos foi o de 2010-11, com 8 (61%) amostras positivas (6 pinguins-antártico e 2 skuas-subantárticas), seguido do verão 2012-13 com 3 (23%) amostras positivas de pinguim-antártico, e do verão 2011-12, com 2 (15%) amostras positivas da mesma espécie (Figura 20).

Figura 20: Gráfico mostrando a distribuição de amostras positivas na detecção viral de acordo com os meses de coleta e as espécies.



5.2.3 Sorologia e Detecção viral

Dentre as aves marinhas amostradas nas ilhas Elefante e Rei George, 469 tiveram o soro e os swabs - orotraqueal e cloacal - coletados e analisados por sorologia (cELISA) e detecção viral (*One Step Real Time RT-PCR*), respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4- Distribuição dos indivíduos amostrados com coleta de soro e *swab* orotraqueal e cloacal, que tiveram as amostras analisadas por sorologia e detecção viral, nas ilhas Elefante e Rei George.

Nome popular	Ilha Elefante			Ilha Rei George	Total
	Verão 2010-11	Verão 2011-12	Verão 2012-13	Verão 2011-12	
pinguim-antártico	19	33	23	-	75
pinguim-papua	12	36	108	2	158
pinguim-de-Adelie	-	-	-	21	21
skua-subantártica	22	24	30	-	76
pomba-do-cabo	35	32	26	-	93
petrel-gigante-do-sul	-	-	46	-	46
	88	125	233		
	446			23	469

Dentre os indivíduos amostrados com coleta de soro e *swabs* analisados por sorologia e detecção viral, cinco tiveram as amostras positivas nas duas metodologias, todos da ilha Elefante (Tabela 5 e APÊNDICE).

Tabela 5- Detalhes dos indivíduos amostrados com coleta de soro e *swabs*, e que tiveram suas amostras positivas por sorologia e detecção viral.

Amostra	Nome popular	Data	Local
AE 35	skua-subantártica	31/12/2010	Ilha Elefante
AE 66	skua-subantártica	02/01/2011	Ilha Elefante
AE 178	pinguim-antártico	23/01/2011	Ilha Elefante
AE 299	pinguim-antártico	01/11/2011	Ilha Elefante
AE 597	pinguim-antártico	26/11/2012	Ilha Elefante

5.2.4 Sequenciamento genético

Dentre as 13 amostras positivas pelo método de *One Step Real Time RT-PCR*, 4 (30%) geraram sequência (AE 21, AE 66, AE 175 e AE 177) para o gene da proteína de Matriz do vírus IA. O alinhamento das sequências nucleotídicas das amostras positivas e do controle positivo da reação, evidenciando as similaridades existentes entre elas, pode ser visto na Figura 21.

Figura 21: Alinhamento das sequências da proteína de Matriz do vírus Influenza A, de 245 pb, geradas pelas amostras positivas e pelo controle positivo (C+). O alinhamento demonstra a similaridade entre as amostras positivas e o controle positivo de Influenza A.

		10	20	30	40	50
C+		TCTTCTAACC	GAGGTCGAAA	CGTACGTTCT	CTCTATCGTC	CCGTCAGGCC
AE21		TCTTCTAACC	GAGGTCGAAA	CGTACGTTCT	CTCTATCGTC	CCGTCAGGCC
AE66		TCTTCTAACC	GAGGTCGAAA	CGTACGTTCT	CTCTATCGTC	CCGTCAGGCC
AE175		TCTTCTAACC	GAGGTCGAAA	CGTACGTTCT	CTCTCTCGTC	CCGTCAGGCC
AE177		TCTTCTAACC	GAGGTCGAAA	CGTACGTTCT	CTCTATCGTC	CCGTCAGGCC
		60	70	80	90	100
C+		CCCTCAAAGC	CGAGATCGCG	CAGAGACTTG	AAGATGTGTT	TGCAGGGAAG
AE21		CCCTCAAAGC	CGAGATCGCG	CAGAGACTTG	AAGATGTCTT	TGCTGGGAAG
AE66		CCCTCAAAGC	CGAGATCGCG	CAGAGACTTG	AAGATGTCTT	TGCTGGGAAG
AE175		CCCTCAAAGC	CGAGATCGCG	CAGAGACTTG	AAGATGTCTT	TGCTGGGAAG
AE177		CCCTCAAAGC	CGAGATCGCG	CAGAGACTTG	AAGATGTCTT	TGCTGGGAAG
		110	120	130	140	150
C+		AACACCGATC	TTGAGGCACT	CATGGAGTGG	CTAAAGACAA	GACCAATCCT
AE21		AACACAGATC	TCGAGGCACT	CATGGAATGG	CTAAAGACAA	GACCAATCCT
AE66		AACACAGATC	TCGAGGCACT	CATGGAATGG	CTAAAGACAA	GACCAATCCT
AE175		AACACAGATC	TCGAGGCACT	CATGGAATGG	CTAAAGACAA	GACCAATCCT
AE177		AACACAGATC	TCGAGGCACT	CATGGAATGG	CTAAAGACAA	GACCAATCCT
		160	170	180	190	200
C+		GTCACCTCTG	ACTAAGGGGA	TTTTAGGGTT	TGTGTTACAG	CTCACCGTGC
AE21		GTCACCTCTG	ACCAAGGGGA	TTTTAGGGTT	TGTGTTACAG	CTCACCGTGC
AE66		GTCACCTCTG	ACCAAGGGGA	TTTTAGGGTT	TGTGTTACAG	CTCACCGTGC
AE175		GTCACCTCTG	ACCAAGGGGA	TTTTAGGGTT	TGTGTTACAG	CTCACCGTGC
AE177		GTCACCTCTG	ACCAAGGGGA	TTTTAGGGTT	TGTGTTACAG	CTCACCGTGC
		210	220	230	240	
C+		CCAGTGAGCG	AGGACTGCAG	CGTAGACGCT	TTGTCCAAAA	TGCCCTA
AE21		CCAGTGAGCG	AGGACTGCAG	CGTAGACGCT	TTGTCCAAAA	TGCCCTA
AE66		CCAGTGAGCG	AGGACTGCAG	CGTAGACGCT	TTGTCCAAAA	TGCCCTA
AE175		CCAGTGAGCG	AGGACTGCAG	CGTAGACGCT	TTGTCCAAAA	TGCCCTA
AE177		CCAGTGAGCG	AGGACTGCAG	CGTAGACGCT	TTGTCCAAAA	TGCCCTA

5.2.5 Isolamento viral

Não houve crescimento viral em nenhum dos cultivos das seis amostras positivas seleccionadas para isolamento em ovo embrionado: AE 35, AE 66, AE 160, AE 175, AE 177 e AE 597.

5.2.6 Sequenciamento genético de nova geração

Das quatro amostras sequenciadas por *Ion Torrent PGM Sequencing*, apenas a amostra AE 66, referente a uma skua-subantártica, coletada em 2010 na ilha Elefante, amplificou e gerou sequência completa para os oito segmentos do vírus IA (Figura 22). Até o momento, apenas as análises das sequências para as proteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) estão completas.

Figura 22: Análise eletroforética em gel de agarose 0,8%, dos produtos amplificados dos oito segmentos virais do Influenza A na amostra AE66 (vermelho). As setas indicam as proteínas virais amplificadas e seus respectivos tamanhos. O peso molecular utilizado foi o *50 pb DNA Ladder (Invitrogen by Life Technologies)*.



As árvores filogenéticas para os genes codificadores de HA (Figura 23) e NA (Figura 24) demonstraram que o tipo viral identificado neste estudo foi o H6N8. Estes cladogramas foram sustentados com altos valores de *bootstrap* (> 70% para HA; >90% para NA) para ambos os genes.

Figura 23: Dendrograma cosntruído a partir da sequência completa da glicoproteína viral hemaglutinina (HA) proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras seqüências de HA, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro GTR (*General Time Reversible*) indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 70% foi obtido em análise de 1000 réplicas, e estão apresentadas nos pontos de ramificação. A análise das seqüências demonstra que a HA encontrada neste estudo, em vermelho, está associada ao tipo H6. Em azul, o clado da H11, onde está a HA encontrada na região subantártica por Hurt e colaboradores (2014), evidenciando a distância entre as HAs encontradas na região.

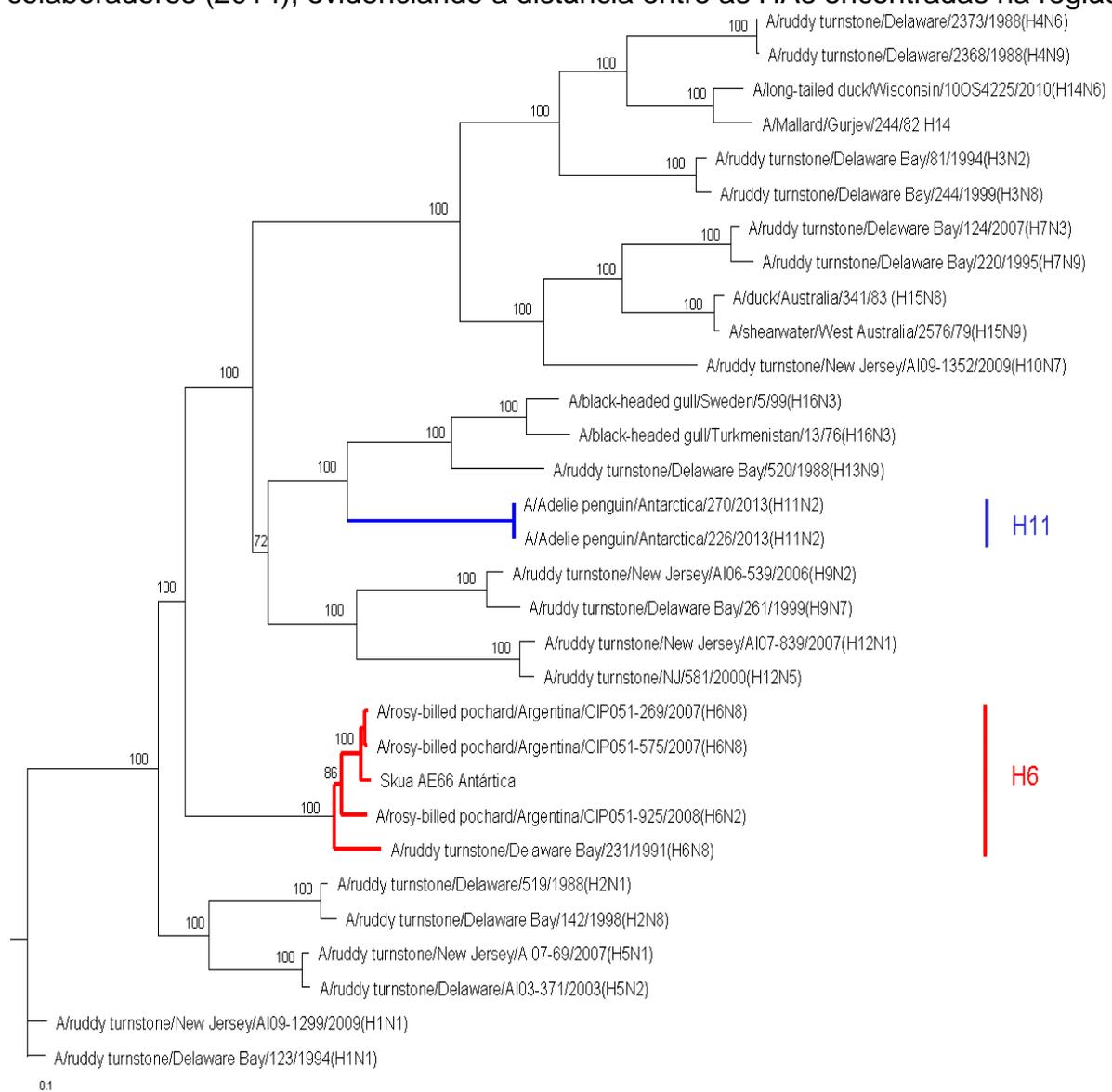
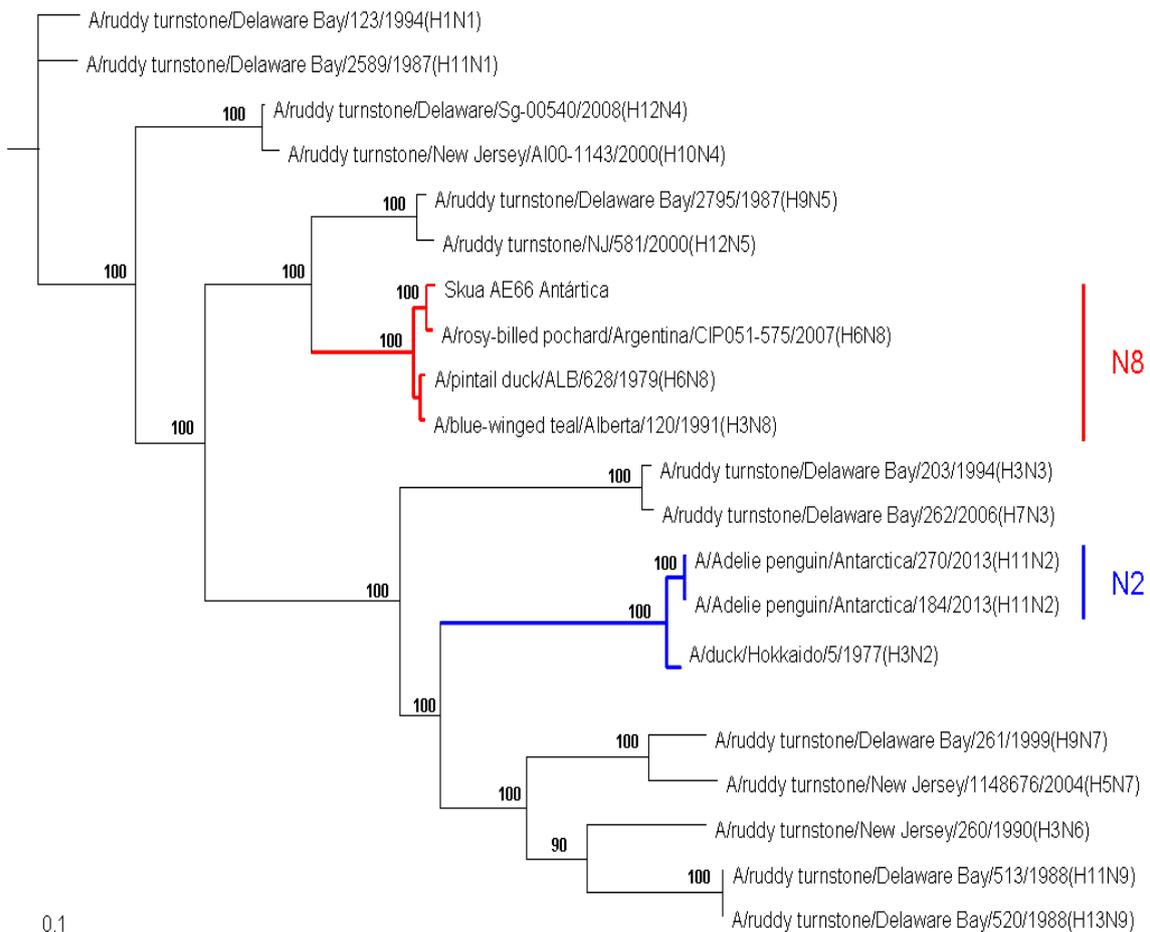


Figura 24: Dendrograma construído a partir da sequência completa da glicoproteína viral neuraminidase (NA) proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras sequências de NA, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro GTR (*General Time Reversible*) indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 90% foi obtido em análise de 1000 réplicas, e estão apresentadas nos pontos de ramificação. A análise das sequências demonstra que a NA encontrada neste estudo, em vermelho, está associada ao tipo N8. Em azul, o clado da N2, onde está a NA encontrada na região subantártica por Hurt e colaboradores (2014), evidenciando a distância entre as NAs encontradas na região.



A árvore filogenética para a H6 e a N8 identificadas neste estudo agrupou-se em um clado bem definido com outras isoladas na Argentina, em 2007, em *Netta peposaca* (marrecão) (Figura 25 e Figura 26). Os clados foram sustentados com altos valores de *bootstrap* para HA e NA (>60%).

Figura 25: Dendrograma construído a partir da sequência completa da glicoproteína viral hemaglutinina (HA) 6 proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras sequências de HA 6, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro *GTR (General Time Reversible)* indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 60% foi obtido em análise de 1000 réplicas e estão apresentadas nos pontos de ramificação. A análise das sequências demonstra que a H6 encontrada neste estudo, em vermelho, está associada a um clado bem definido para outras H6 encontradas na Argentina.

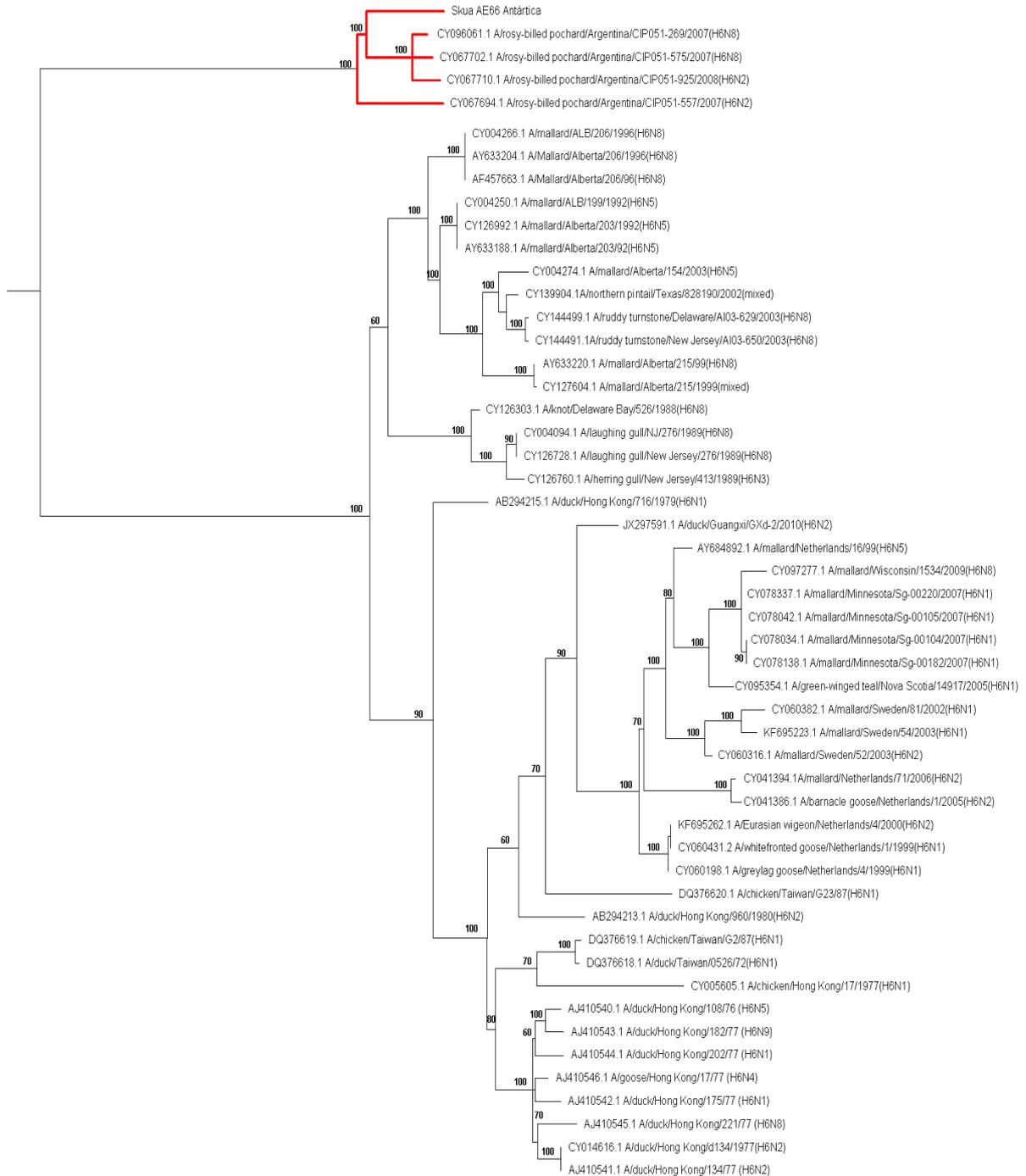
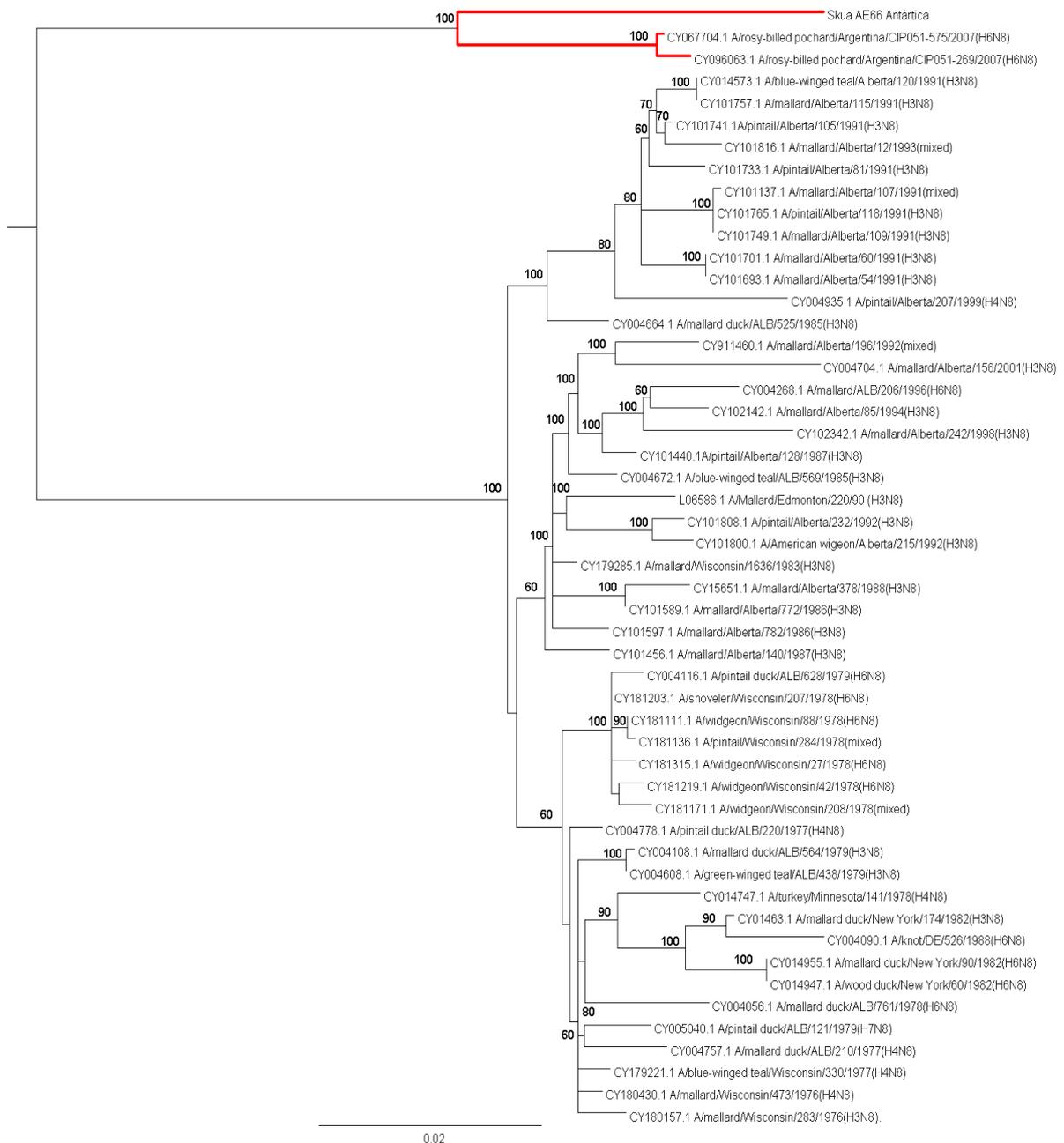


Figura 26: Dendrograma construído a partir da sequência completa da glicoproteína viral neuraminidase (NA) 8 proveniente do vírus encontrado na amostra AE 66 deste estudo, e de outras sequências de N8, depositadas no banco de dados do *GenBank*. A árvore filogenética foi construída com auxílio do programa *PAUP 4.0b10*, algoritmo *Neighbor-Joining* com parâmetro GTR (*General Time Reversible*) indicado pelo *modelTest*. O *bootstrap* > 60% foi obtido em análise de 1000 réplicas e estão apresentadas nos pontos de ramificação. A análise das sequências demonstra que a N8 encontrada neste estudo, em vermelho, está associada a um clado bem definido para outras N8 encontradas na Argentina.



6 DISCUSSÃO

Neste estudo, dos 585 indivíduos amostrados com coleta de *swab* orotraqueal e cloacal, 13 (2.1%) amostras, todas da Ilha Elefante, foram detectadas positivas para o vírus IA, pelo método de *Real time RT-PCR*, e uma foi caracterizada como sendo do subtipo H6N8. Dos 673 indivíduos amostrados com coleta de soro, 108 (16,2%) amostras provenientes das ilhas Elefante e Rei George, foram positivas para anticorpos anti-IA, pelo método de Ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA)

6.1 Métodos de diagnóstico

A técnica de *AIV Antibody Test Kit, ELISA (IDEXX MultiS-Screen)* utilizada nas amostras de soro do presente, detecta a presença de anticorpos de Influenza aviária em soros de galinha, peru, pato, avestruz e ganso e, por isso, foi questionada por Claes e colaboradores (2012) sobre o seu uso em aves selvagens. Este *kit* foi desenvolvido utilizando-se um conjugado formado por anticorpo monoclonal anti-IA de rato. Anticorpos do hospedeiro no soro testado competem com os anticorpos monoclonais pela ligação ao antígeno da placa de ensaio (BROWN et al., 2009b; IDEXX, 2012). Desta forma, este ensaio sorológico deve funcionar com precisão em qualquer espécie de ave. Além disso, estudos feitos em equídeos (KITTELBERGER et al., 2010) e suínos também utilizou o método e encontrou sensibilidade de 82%, e especificidade de 87%, para testes com o soro desses animais (TSE et al., 2011). Apesar de haverem poucos estudos que comprovem a precisão desses testes em aves selvagens (BROWN et al., 2009b), a metodologia vem sendo amplamente utilizada em diversos estudos sorológicos nessas aves, demonstrando boa confiabilidade (GAIDET et al., 2012; HOYE et al., 2010; LEWIS et al., 2013; STALLKNECHT et al., 2012; WILSON et al., 2013).

Quando comparada à RT-PCR, a técnica de *One Step Real Time RT-PCR*, escolhida para as análises moleculares das amostras de *swab* deste estudo, demonstra ser mais rápida e reduz a possibilidade de contaminação cruzada, pois diminui o manuseio das amostras (SPACKMAN et al., 2002). O uso da sonda fluorescente do tipo *TaqMan*, também utilizada neste estudo, é específica para a proteína da matriz viral do IA, e aumenta a especificidade do teste, pois só gera fluorescência quando há amplificação do cDNA alvo (SPACKMAN et al., 2002; WHO,

2011). A técnica é 93% específica e 100% sensível, quando comparada à cultura celular (TEMPLETON et al., 2004) e tem sido amplamente utilizada para a detecção do vírus Influenza em diversos estudos (HURT et al., 2014; LEWIS et al., 2013; RIMONDI et al., 2011).

No presente estudo, 16,2% das amostras de soro coletadas foram positivas para a presença de anticorpos contra o vírus IA. No entanto, das amostras de *swab*, em apenas 2,1% foi detectado o genoma viral. Em nenhuma das amostras foi obtido sucesso no isolamento em ovo embrionado. Essa diferença na positividade entre as técnicas molecular e sorológica também foi observada por Hurt e colaboradores (2014), em amostras de pinguins-de-Adelie da Ilha Rei George e Península Antártica, no qual 15,9% dos soros e 2,7% dos *swabs* analisados foram positivos para IA. No mesmo estudo, em 50% das amostras detectadas positivas pela técnica de biologia molecular houve isolamento em ovo embrionado. Essa técnica detecta o antígeno viral presente na amostra, e conseqüentemente, sua eliminação pelo hospedeiro no momento exato da coleta. Entretanto, a sorologia detecta a presença de anticorpos específicos contra o vírus, que podem estar presentes no hospedeiro por um período maior de tempo, o que indica um contato prévio com o vírus estudado. O uso das duas metodologias, sorologia e biologia molecular, é importante para demonstrar quais espécies de aves selvagens tiveram contato com o vírus, pela sorologia, e quais estão infectadas, com o uso da biologia molecular. Assim, a sorologia pode ser usada como um método de triagem para a vigilância do vírus IA em aves selvagens.

No presente estudo, tanto as amostras de soro, quando as de *swab* tiveram uma quantidade maior de coleta no verão 2012-13, seguido do verão 2011-12, e por último, o de 2010-11. Entretanto, com relação às amostras positivas nos diferentes métodos, o verão 2010-11 teve a maior detecção viral, com 61% (8/13), enquanto que a maior soroprevalência foi encontrada no verão seguinte, de 2011-12, com 47% (51/108). Neste mesmo verão, a detecção viral foi a mais baixa, com 15% (2/13) de amostras positivas, enquanto que a menor soroprevalência foi encontrada no verão 2012-13, 22% (24/108), novamente o verão seguinte a menor detecção viral. Esses resultados sugerem que pode haver uma relação entre detecção viral e sorologia. Uma alta taxa de infecção nas aves no verão 2010-11, explicaria a alta prevalência de anticorpos para o vírus IA no ano seguinte. Da mesma forma, a baixa infecção detectada no verão 2011-12, poderia estar relacionada com a menor soroprevalência

encontrada no verão 2012-13. Estudos longitudinais precisam ser feitos, a fim de traçar um perfil epidemiológico na região estudada.

O isolamento do vírus IA em ovos embrionados de galinha para uma posterior subtipagem das glicoproteínas hemaglutinina e neuraminidase virais, constituem o método padrão para o isolamento viral e identificação de subtipos do vírus IA (HUANG et al., 2012; HURT et al., 2014; LEWIS et al., 2013; SPACKMAN et al., 2002; STALLKNECHT et al., 2012). Stallknecht e colaboradores (2012) demonstraram que existe uma relação direta entre a amplificação de RNA viral a partir de ciclos de amplificação (CT) altos (>40) no *Real Time RT-PCR*, e baixo isolamento viral, o que corrobora com os resultados de Hurtado (2013). Altos CTs significam que a observação da amplificação do genoma viral alvo só foi possível após 40 ciclos da PCR, o que pode ocorrer, principalmente, pelos baixos títulos virais na amostra. Hurt e colaboradores (2014) isolaram o vírus em quatro amostras, de um total de oito, provenientes de pinguins-de-Adelie da Antártica. Os CTs das amostras isoladas eram abaixo de 33, similares às das amostras que foram inoculadas no presente estudo, que variavam entre 26-37. Neste estudo, não foi conseguido isolar o vírus nem mesmo na amostra detectada positiva com CT 26. Neste caso, ou a amostra pode não apresentar o vírus íntegro e infectante, ou estar em quantidade viral tão baixa que é incapaz de causar a morte do embrião, ou ainda estar em níveis indetectáveis pelos testes diagnósticos efetuados no estudo (SPACKMAN et al., 2002).

O sequenciamento genético de nova geração surgiu nos últimos anos como uma ferramenta a mais nas técnicas de biologia molecular, com a finalidade de identificar as sequências nucleotídicas de diversos genes ou organismos. Na virologia, os esforços estão sendo conduzidos quase inteiramente para vírus que causem doenças em seres humanos. No entanto, cada informação gerada tem amplo impacto em todas as áreas da virologia, desde o diagnóstico ao desenvolvimento de vacinas, como na evolução e ecologia viral (RADFORD et al., 2012). Neste estudo, utilizamos a plataforma *Ion Torrent PGM* no sequenciamento completo dos genes do vírus IA. Apesar da dificuldade nas análises de bioinformática e da necessidade de referências apropriadas para a comparação das sequências, o método demonstrou ser rápido e capaz de identificar vírus não cultiváveis. Além disso, foi possível caracterizar o vírus IA encontrado na amostra, sem a necessidade do isolamento viral em ovo embrionado. Apesar de não comprovar a infectividade do vírus, o resultado do

sequenciamento de nova geração gerou informações filogenéticas importantes para o conhecimento dos aspectos ecológicos do vírus IA na região subantártica.

6.2 Resultados

A maioria das amostras, tanto de soro (93%), quanto de *swab* (92%) coletadas neste estudo, foi proveniente da ilha Elefante. Isso deveu-se a dificuldade logística (transporte, tempo e material) nas atividades de coleta na Ilha Rei George.

As aves que apresentaram amostras positivas, tanto pelo cELISA quanto pelo *Real time RT-PCR*, foram das espécies *Pygoscelis adeliae* (pinguim-de-Adelie), *P. antarcticus* (pinguim-antártico) e *Catharacta lonnbergi* (skua-subantártica).

Na ilha Rei George não houve detecção molecular, entretanto foram encontrados 10% (2/19) de soroprevalência para anticorpos anti-IA em pinguim-antártico, e 4% (1/22) em pinguim-de-Adelie. Este achado corrobora com BAUMEISTER et al. e colaboradores (2004), que encontraram 10,8% de amostras de soro positivas em pinguins-antártico da mesma ilha. Com relação aos pinguins-de-Adelie, diversos estudos já encontraram anticorpos para o vírus IA nessas aves (BAUMEISTER et al., 2004; MORGAN; WESTBURY, 1988). Em estudo recente, Hurt e colaboradores (2014), obtiveram 16% de soroprevalência e 2% de detecção viral em amostras de pinguins-de-Adelie da Ilha Rei George e Kopaitik. Este estudo foi o primeiro a isolar o vírus IA na Antártica, o qual ficou caracterizado como sendo do subtipo H11N2.

Os pinguins-de-Adelie têm uma distribuição populacional mais restrita à região antártica, enquanto os pinguins-antárticos têm distribuição circumpolar um pouco mais ampla. A presença de anticorpos para o vírus IA nos soros de ambas as espécies, expressa uma circulação deste vírus na região subantártica, uma vez que essas espécies são residentes circumpolares e não fazem grandes deslocamentos, sugerindo que a infecção ocorreu no próprio ambiente. Segundo Wallensten e colaboradores (2006) as evidências sorológicas de exposições anteriores em pinguins na Antártica indicam que ou o vírus é endêmico na região para essas aves, ou outro hospedeiro desconhecido está repetidamente introduzindo o vírus a partir de outros continentes.

Na Ilha Elefante, a soroprevalência para pinguins-antárticos foi de 38% (29/75), e 87% (76/87) para skuas-subantárticas. Na detecção viral, a incidência de positivos para pinguins-antárticos foi de 8% (11/124), e 2% (2/79) para skuas-subantárticas.

Estudos anteriores sobre o vírus IA já foram realizados em ambas as espécies, em outras regiões da Antártica, entretanto, houve uma grande variação na soroprevalência em todos eles, e nenhum obteve detecção viral (AUSTIN; WEBSTER, 1993; BAUMEISTER ET AL. et al., 2004; MILLER et al., 2008). Sendo assim, todos os registros encontrados pelo presente estudo, efetuados na ilha Elefante, são inéditos.

Em Stinker Point, região da Ilha Elefante onde foram realizadas as coletas deste estudo, o pinguim-antártico é a espécie mais abundante de pinguim e, durante a época reprodutiva, no verão austral, milhares deles se aglomeram em colônias. A quantidade de fezes dessas aves nas colônias é tão significativa que, em alguns casos pode ser observada em imagens de satélite (HURT et al., 2014). Uma das vias de transmissão dos vírus IA é a fecal-oral, desta forma, este parece ser um comportamento natural que pode facilitar a transmissão viral entre essas aves. Diferentemente dos pinguins-antárticos, as skuas-subantárticas raramente formam colônias, ao invés disso, nidificam ao lado das colônias de pinguins, a fim de predares seus ovos e filhotes. Estudos já demonstraram que aves, em particular os pinguins, são a preferência alimentar na dieta das skuas-subantárticas (CARNEIRO et al., 2014; MARZOF; QUINTANA, 2008; YOUNG, 1994), o que foi comprovado pela observação pessoal. Os altos resultados positivos para IA em skuas-subantárticas e pinguins-antárticos da ilha Elefante podem estar ligados às relações ecológicas que as duas espécies dividem entre si durante o verão austral. Hoye e colaboradores (2010) sugerem que a dinâmica da resposta imune do hospedeiro pode ser influenciada não só pela ecologia do agente patogênico, mas também pela história de vida do hospedeiro.

Neste estudo foi encontrada sorologia positiva em três indivíduos de skua-subantártica recapturados em dois verões distintos (2011-12 e 2012-13). O método sorológico utilizado nas análises não permite diferenciar a classe de imunoglobulina (anticorpo) identificada e, desta forma, não permite levantar hipóteses sobre o tempo de infecção (LEBARBENCHON et al., 2012). Entretanto, os resultados indicam que ou a exposição ao vírus é contínua, ou a resposta imune do hospedeiro se manteve entre os dois verões. A falta de conhecimento sobre a dinâmica dos anticorpos e da resposta imune em skuas-subantárticas dificulta traçar um perfil epidemiológico da transmissão nestas espécies, e da ecologia do vírus IA na região. Destaca-se então a necessidade de estudos futuros privilegiando esta espécie na região subantártica.

Todas as amostras coletadas e analisadas de pinguins-papua, petréis-gigantes-do-sul e pombas-do-cabo, da Ilha Elefante, tiveram resultados negativos. Anticorpos para o vírus IA já foram encontrados em soros de pinguins-papua coletados nas ilhas Georgia do Sul e Livingston, e em petréis-gigantes-do-sul coletados na Ilha Rei George (ABAD et al., 2013; BAUMEINSTER et al., 2004; WALLENSTEIN et al., 2006). Os petréis-gigantes-do-sul têm hábitos alimentares oportunistas (KERRY et al., 1998), e apresentam distribuição populacional e comportamento migratório amplos (BI, 2014), o que poderia favorecer a transmissão de patógenos. Aves anilhadas na Antártica já foram recapturadas na Austrália e Nova Zelândia (PATTERSON et al., 2008). Além disso, existem registros de petréis-gigantes-do-sul e de pombas-do-cabo na Argentina, Uruguai, Peru, Chile, Equador e Brasil (COSTA et al., 2011; OTLEY et al., 2007). Das três espécies que apresentaram sorologia negativa para o vírus IA, o pinguim-papua é a única que parece ter uma distribuição circumpolar mais restrita, com colônias de indivíduos no limite das Ilhas Falkland e Georgia do Sul. Esses achados demonstram que a prevalência do vírus IA pode variar consideravelmente no continente antártico.

No presente estudo, das 13 amostras detectadas positivas para o vírus IA, nenhuma foi isolada em ovo embrionado. Entretanto, uma amostra proveniente de skua-subantártica coletada em 2010 na Ilha Elefante, teve o sequenciamento genético completo do vírus IA. A caracterização molecular revelou pertencer ao subtipo H6N8, classificado como de baixa patogenicidade pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1980). Este subtipo caracterizado não apresentou proximidade filogenética com o H11N2 recentemente isolado por Hurt e colaboradores (2014) em amostras de pinguim-de-Adelie coletadas em 2013, nas ilhas Rei George e Kопaitik. Entretanto, demonstrou similaridade filogenética agrupando-se em um clado bem definido com outro subtipo H6N8 isolado em ave da espécie *Netta peposaca* (marrecão), na Argentina em 2007 (PEREDA et al., 2008).

A glicoproteína hemaglutinina H6 é uma das mais registradas em aves selvagens no mundo (MUNSTER et al., 2007; OLSEN et al., 2006; WALLENSTEN et al., 2007). No entanto, devido às análises filogenéticas da H6 e também da N8 do subtipo isolado na Argentina, foi sugerida por Rimondi e colaboradores (2011) uma possível linhagem evolutiva única destas glicoproteínas para a América do Sul. A formação de um clado separado para a América do Sul já havia sido observada em

análises filogenéticas de outros subtipos isolados na Argentina (ÁLVAREZ et al., 2010; PEREDA et al., 2008).

A similaridade entre o H6N8, caracterizado neste estudo, e outro isolado na Argentina, sugere que deve haver um movimento inter-continental do vírus IA, entre a América do Sul e a Antártica. Na região subantártica, a ilha Elefante é a maior das Ilhas ao norte do arquipélago Shetlands do Sul, e a que apresenta uma proximidade maior com a América do Sul, a 1500 km. Isso possibilita às populações de aves migratórias da Ilha Elefante um maior contato com aves do continente sul-americano. As skuas-subantárticas são aves que migram longas distâncias ao final do verão austral, período em que têm contato com várias outras aves, em diferentes locais fora da região subantártica (HURT et al., 2014; MILLER et al., 2008). Apesar de ter um comportamento migratório pouco descrito, existem registros da espécie no Brasil, Argentina e Chile (COSTA et al., 2011; HURTADO et al., 2012). Desta forma, as skuas-subantárticas poderiam estar participando no transporte do vírus entre a América do Sul e a região subantártica. Para Kerry e Riddle (1998), essa espécie poderia ser uma eficaz transportadora de doenças na Antártica, uma vez que se move ao redor da costa deste continente e tem um contato estreito com muitas outras espécies, devido a característica de predador oportunista.

6.3 Considerações sobre a presença do vírus Influenza A em aves da região subantártica

A presença do vírus Influenza A na região subantártica pode ser determinada por fatores como, a permanência do vírus no ambiente, o contato entre humanos e animais e a migração de aves e mamíferos para o continente no verão austral.

A transmissão do vírus IA é preferencialmente do tipo fecal-oral (BROWN et al., 2009a), sendo assim, os vírus eliminados por animais infectados no ambiente poderão servir para infectar outros que compartilhem do mesmo local. Estudos geralmente focam na transmissão e manutenção desse vírus de forma biótica, ou seja, entre animais. No entanto, alguns trabalhos feitos em potenciais reservatórios abióticos, como a água de lagos utilizados por aves migratórias, demonstraram uma alta permanência do vírus IA preservado em ambientes gelados, e que têm suas águas congeladas durante pelo menos seis meses do ano (ZHANG et al., 2006). O aumento na temperatura (>17°C) da água, assim como da salinidade (>25.000 ppm) parecem

interferir negativamente para a persistência do vírus (BROWN et al., 2009a; STALLKNECHT et al., 1990). Nas Ilhas Elefante e Rei George, pequenos lagos e coleções de água são formados pelo degelo das geleiras durante o verão austral, os quais voltam a congelar novamente no restante do ano. Esses lagos são compartilhados por aves e mamíferos como locais de banho, alimentação, descanso, defecação ou de passagem durante todo o período em que permanecem nessas ilhas. Sendo assim, essas águas podem servir como reservatório do vírus IA, e são um fator importante a ser considerado na permanência desses vírus nessas ilhas.

Nos últimos anos tem ocorrido uma expansão da presença humana na Antártica, devido às bases de pesquisa e ao aumento do turismo na região (CURRY et al., 2002; HURT et al., 2014; KERRY; RIDDLE, 2009; THOMAZELLI et al., 2010; TIN et al., 2009). Em ambos os casos, a aproximação humana das colônias de animais selvagens causa um estresse capaz de alterar diversos parâmetros fisiológicos e a interrupção de hábitos naturais, como, por exemplo, a dispersão de pinguins para fora da colônia e o abandono de ovos (TIN et al., 2009). No que se refere ao turismo, pessoas caminham entre colônias de aves e mamíferos com botas de uso pessoal e, além disso, manipulam os animais, contrariando a política preventiva de limpeza de botas e restrição do contato com a fauna local previstas pela Associação Internacional de Turismo na Antártica (CURRY et al., 2002). Curry e colaboradores (2002) isolaram as bactérias patogênicas *Klebsiella* sp. e *Leclercia adecarboxylata* em amostras de botas de turistas que estavam desembarcando no continente antártico (CURRY et al., 2002). Esses exemplos demonstram que práticas de prevenção à introdução de patógenos devem ser respeitadas.

Além do contato humano, outra forma importante de introdução de patógenos na Antártica seria pela migração natural de animais, pois existe uma variedade de rotas migratórias ao redor do continente antártico. Para Sugimono (2006) aves com rotas de migração ao redor da Antártica poderiam introduzir o vírus IA na América do Norte. Essas mesmas rotas conectam-se com outras existentes nos continentes da Oceania, África e América do Sul (SUGIMONO, 2006). Aves migratórias das espécies *Larus dominicanus* (gaivotão), *Sterna vittata* (trinta-réis-antártico), *Catharacta lonnbergi* (skua-subantártica), *Macronectes giganteus* (petrel-gigante-do-sul) e *Sterna paradisaea* (trinta-réis-do-ártico) - esta última com a maior migração já registrada - habitam as ilhas subantárticas durante o verão austral (COSTA et al., 2011; EVEGANG et al., 2010). Além da rota migratória de aves, estima-se que as águas da

Antártica contenham cerca de 50% da população de focas do mundo, 80% da biomassa de pinípedes e são áreas de alimentação para uma diversidade de espécies de cetáceos durante o verão (KERRY; RIDDLE, 2009). Existem diversos estudos de doenças em mamíferos marinhos, dentre os quais alguns vírus já foram isolados desses animais, como o pox vírus, calicivírus, morbilivírus e o vírus IA (ANTHONY et al., 2012; BLANC et al., 2009; BROWN et al., 2010; HINSHAW et al., 1984; PEARCE; WILSON, 2003). Análises filogenéticas e antigênicas de vírus IA, encontrados em mamíferos marinhos na costa leste dos Estados Unidos, sugerem que a origem dos vírus é aviária e que são, mais o resultado de uma transmissão oriunda de aves aquáticas, do que de linhagens circulando nesses mamíferos (ANTHONY et al., 2012; WEBSTER et al., 1981). Durante o verão austral, as Ilhas Elefante e Rei George são locais de reprodução de aves e mamíferos, onde esses animais se agregam e dividem o ambiente terrestre e marinho. Devido ao hábito alimentar oportunista de algumas espécies, além de peixes e invertebrados, carcaças de aves e mamíferos marinhos, o lixo oriundo de estações de pesquisas ou de outros continentes são alimentos para aves como a skua-subantártica (REINHARDT et al., 2000). O contato muito próximo entre as diferentes espécies de aves e mamíferos facilita a transmissão do vírus IA e deve ser considerada como um fator de introdução deste vírus no ambiente subantártico.

Mais estudos precisam ser realizados de forma contínua a fim de avaliar a epidemiologia de doenças na região. O histórico de estudos do vírus IA no continente antártico demonstra que existe uma deficiência desse acompanhamento na Antártica. Isso ocorre devido a dificuldade logística na chegada e permanência dos pesquisadores na região, ou mesmo pelo monopólio da pesquisa exercido por nações que têm interesse em outros temas de pesquisa. A importância da compreensão da ecologia global do vírus IA, a fim de evitar novas pandemias em locais de densidade demográfica alta, pode, muitas vezes, colocar o ambiente antártico como secundário nos interesses da comunidade científica. Os resultados do presente estudo, novos e inéditos, contribuem para o conhecimento do vírus IA na região subantártica, pois demonstram um movimento de transmissão viral que, possivelmente, contribui para a introdução e permanência do vírus na região.

É importante lembrar que a continuidade da pesquisa científica brasileira na Antártica é condição essencial para que o país mantenha sua posição de Membro Consultivo do Tratado da Antártica. Desta forma, espera-se que o presente trabalho

estímule os investimentos do Programa Antártico Brasileiro na área de vigilância epidemiológica do vírus IA.

Espera-se, também, que este conhecimento sensibilize a comunidade científica internacional e ponha em evidência a importância do estudo dos vírus IA na região subantártica.

Assim, algumas recomendações para a ampliação dos estudos e prevenção dos riscos de transmissão, referentes ao vírus IA na região, podem ser consideradas, como:

I) O Programa Antártico Brasileiro deve estimular a vigilância epidemiológica nas populações de aves da região subantártica, principalmente, da espécie *Catharacta lonnbergi* (skua-subantártica) e da Ordem Sphenisciformes, pela comunidade científica;

II) A comunidade científica internacional deve desenvolver colaborações entre instituições de vigilância epidemiológica, e outras que realizam estudos na Antártica, a fim de manter um monitoramento sanitário das aves e mamíferos na região subantártica;

III) A comunidade científica internacional deve estimular estudos que gerem informações sobre o movimento migratório das aves e mamíferos na região subantártica;

IV) A associação Internacional de Turismo na Antártica deve restringir as atividades de turismo, principalmente, a aproximação com as colônias de aves e mamíferos marinhos na região subantártica;

V) O Tratado da Antártica deve tornar obrigatório o uso de equipamentos de proteção individual para pesquisadores em contato com aves e mamíferos marinhos na Antártica;

7 CONCLUSÕES

1. A detecção molecular e caracterização do vírus Influenza A em aves marinhas da região subantártica demonstra a presença do vírus neste ambiente, podendo ser transportado ou mantido na região por aves marinhas e migratórias que habitam as ilhas subantárticas.
2. A presença de anticorpos para o vírus Influenza A em soro de aves marinhas da região subantártica, em diferentes anos de coleta, indica a circulação e permanência deste vírus em tal ambiente.
3. A estreita relação ecológica entre as aves marinhas que tiveram detecção molecular e sorológica positivas para o vírus Influenza A sugere que hábitos comportamentais das aves influenciam a transmissão viral.
4. A forte similaridade entre o vírus Influenza A caracterizado neste estudo, e outro isolado na Argentina, demonstra que o vírus ultrapassa barreiras geográficas, sendo introduzido e transportado pela fauna marinha migratória da região subantártica.

REFERÊNCIAS*

ABAD, F. X.; BUSQUETS, N.; SANCHEZ, A.; RYAN, P. G.; MAJÓ, N.; GONZALEZ-SOLÍS, J. Serological and virological surveys of the influenza A viruses in Antarctic and sub-Antarctic penguins. **Antarctic Science**, v. 25, n. 2, p. 339-344, 2013.

AUSTRALIAN ANTARCTIC DIVISION. Australian Government – Department of the Australian Antarctic Division. 2003. Disponível em: <www.antarctica.gov.au/about-antarctica/environment/geography/antarctic-convergence> Acesso em: 13 maio 2014.

_____. Australian Government – Department of the Australian Antarctic Division. 2010. Disponível em: <www.antarctica.gov.au/about-antarctica/wildlife/animals/flying-birds> Acesso em: 13 maio 2014.

_____. Australian Government – Department of the Australian Antarctic Division. 2012, Disponível em: <<http://www.antarctica.gov.au/about-antarctica/wildlife/animals/flying-birds/skuas>> Acesso em: 17 maio 2014.

_____. Australian Government – Department of the Australian Antarctic Division. 2014. Disponível em: https://data.aad.gov.au/aadc/biodiversity/species_near_place.cfm?type=Fauna,lat=-62.4405556,lon=-59.9430556,offset=1.0 Acesso em: 17 maio 2014.

ALEXANDER, D. J. A review of avian influenza in different bird species. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 3-13, 2000.

ALEXANDER, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, v. 25, n. 30, p. 5637-5644, 2007.

ALEXANDER, D. J. Avian Influenza - Diagnosis. **Zoonosis and Public Health**, v. 55, p. 16-23, 2008.

ALVAREZ, P.; MATTIELLO, R.; RIVAILLER, P.; PEREDA, A.; DAVIS, C. T.; BOADO, L.; D'AMBROSIO, E.; AGUIRRE, S.; ESPINOSA, C.; LA TORRE, J.; DONIS, R.; MATTION, N. First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina. **Virology**, v. 390, p. 76-84, 2010.

ANCEL, A; BEAULIEU, M.; GILBERT, C. The different breeding strategies of penguins: a review. **Elsevier**, v. 336, n. 1, p. 1-12, 2013.

ANTHONY, S. J.; ST. LEGER, J. A.; PUGLIARES, K.; IP, H. S.; CHAN, J. M.; CARPENTER, Z. W.; MACIAS, N. SANCHEZ-LEON, M.; SALIKI, J. T.; PEDERSEN, J.; KARESH, W.; DASZAK, P.; RABADAN, R.; ROWLES, T.; LIPKINA, W. I.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Emergence of fatal avian influenza in New England Harbor Seals. **MBio**, v. 3, n. 4, p. 1-11, 2012.

ANTARCTIC OCEAN LEGACY. Antarctic Ocean Legacy: a vision for circumpolar protection. 2012. Disponível em: <http://www.asoc.org/storage/documents/antarctic_ocean_legacy_a_vision_for_circumpolar_protection.pdf> Acesso em: 05 maio 2014.

ANTARCTIC TREATY SECRETARY. Antarctic Treaty System. 2011. Disponível em: <http://www.ats.aq/e/ats_other_tourism.htm> Acesso em: 13 maio 2014.

ALVAREZ, P.; MATTIELLO, R.; RIVAILLER, P.; PEREDA, A.; DAVIS, C. T.; BOADO, L.; D'AMBROSIO, E.; AGUIRRE, S.; ESPINOSA, C.; LA TORRE, J.; DONIS, R.; MATTION, N. First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina. **Virology**, v. 396, p. 76-84, 2010.

AUSTIN, F. J.; WEBSTER, R. G. Evidence of orth- and paramyxovirus in fauna from Antarctica. **Journal of Wildlife Disease**, v. 29, n. 4, p. 568-571, 1993.

BAUMEISTER ET AL., E.; LEOTTA, G.; PONTORIERO, E.; MONTALTI, D.; VIGO, G.; PECORATO, M.; SAVY, V. Serological evidence of influenza A virus infection in Antarctica migratory birds. **Elsevier**, v. 1263, p. 737-740, 2004.

BARBOSA, A.; MORENO, J.; POTTI, J. Breeding group size, nest position and breeding success in the pinguim-antártico. **Polar Biology**, v. 18, p. 410-414. 1997.

BARBOSA, A.; PALACIOS, M. J. Health of Antarctic birds: a review of their parasites, pathogens and diseases. **Polar Biology**, v. 32, p. 1092-1115, 2009.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. BirdLife International – IUCN Red List for birds. 2014. Disponível em: <<http://www.birdlife.org>> Acesso em: 17 maio 2014.

BLANC, A.; RUCHANSKY, D.; CLARA, M.; ACHAVAL, F.; LE BAS, A.; ARBIZA, J. Serologic Evidence of Influenza A and B Viruses in South American Fur Seals (*Arctocephalus australis*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 2, p. 519-521, 2009.

BOWMAN, A. S.; SREEVATSAN, S.; KILLIAN, M. L.; PAGE, S.L.; NELSON, S. W.; NOLTING, J. M.; CARDONA, C.; SLEMONS, R. D. Molecular evidence for interspecies transmission of H3N2pM/H3N2v influenza A viruses at an Ohio agricultural fair, July 2012. **Emerging Microbes and Infections**, v. 1, p. 1-8, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. 2012. Disponível em: <www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta,idEstrutura=146,idConteudo=8037> Acesso em: 15 maio 2012.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2009. **Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de Newcastle**. Versão 1.3. p. 62. Brasília-DF: Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009. 62p.

_____. Ministério da Educação. **Antártica**: ensino fundamental e ensino médio - Coleção explorando o ensino. Volume 9. Brasília, 2006. 167 p.

BRESALIER, M. 'A most protein disease': aligning medical knowledge of modern Influenza, 1890-1914. **Medical History**, v. 56, n. 4, p. 481-510, 2012.

BRIGGS, L. C.; ASHTON, R. M.; METCALF, P. Development of a highly sensitive screen for influenza A in guano and its application in the search for ancient RNA preserved under Antarctic Adelie penguin colonies. **Avian Disease**, v. 47, n. 3, p. 200-202, 2003.

BRITISH ANTARCTIC SURVEY. British Antarctic Survey – Natural Environment Research Council. 2012. Disponível em:
<http://www.antarctica.ac.uk/about_antarctica/wildlife/seals/index.php> Acesso em: 10 maio 2014.

BRITO, T. **Antártica**: bem comum da humanidade. Brasília. Ministério do Meio Ambiente. 69 p.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, B. A.; MIETZNER, T. A. **Microbiologia médica de Janetz, Melnick e Adelberg**. Porto Alegre: AMGH, 2012. 813 p.

BROWN, J. D.; LUTRELL, M. M. P.; UHART, M.; FERREYRA, H. D., ROMANO, M. M.; RAGO, V.; STALLKNECHT, D. E. Antibodies to Type A Influenza Virus in Wild Waterbirds from Argentina. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 46, n. 3, p. 1040-1045, 2010.

BROWN, J. D.; GOEKJIAN, G.; POULSON, R.; VALEIKA, S.; STALLKNECHT, D. E. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. **Veterinary Microbiology**, v. 136, n. 1-2, p. 20-26, 2009a.

BROWN, J. D.; STALLKNECHT, D. E.; BERGHAUS, R. D.; LUTTRELL, M. P.; KATHERINE, V.; KISTLER, W.; COSTA, T.; YABSLEY, M. J.; SWAYNE, D. Evaluation of a commercial blocking ELISA as a serologic assay for detecting avian influenza virus infection in multiple experimentally infected avian species. **Clinical Vaccine Immunology**. doi:10.1128/CVI.00084-09. 2009b.

CAMPBELL, T. W. Hematology. In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON, L. R. (Ed.). **Avian medicine**: principles and application. Fort Worth-FL: Wingers Publishing, 1994. p. 177-198.

CARBONERAS, C.; JUTGLAR, F. *Procellariiformes* Order. In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J.; CHRISTIE, D.A.; DE JUANA, E. (eds.). **Handbook of the Birds of the World Alive**. Barcelona. Lynx Edicions. 2014. Disponível em:
<<http://www.hbw.com/species>> Acesso em: 17 maio 2014.

CARNEIRO, A. P. B.; MANICA, A.; PHILIPS, R. A. Foraging behaviour And habitat use by brown skuas *Stercorarius lonnbergi* breeding at South Georgia. **Marine Biology**. 2014. doi: 10.1007/s00227-014-2457-z.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. 2014. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>> Acesso em: 09 maio 2014.

_____. 2011. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/change.htm>> Acesso em: 11 maio 2014.

CHEN, H.; LI, Y.; LI, Z.; SHI, J.; FAN, K.; ZHAO, H.; SUN, Y.; KAWAOKA, Y. Outbreak in Migratory Waterfowl in Western Viruses Isolated during an Influenza Properties and Dissemination of H5N1 China. **Journal of Virology**, v. 80, n. 12, p. 5976-5983, 2006.

CHEN, J.; DENG, Y. Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics. **Virology Journal**, v. 6, n. 30, p. 1-3, 2009.

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO. 2012. Disponível em: <www.cnpq.br/programas/proantar/aspectos.htm> Acesso em: 21 maio 2012.

COSTA, E. S.; AYALA, L.; SUL, J. A. I.; CORIA, R.; SANCHEZ-SCAGLIOLI, R. E.; ALVES, M. A. S.; PETRY, M. V.; PIEDRAHITA, P. Antarctic and Sub-Antarctic seabirds in South America - a review. **O Ecologia Australis**, v. 15, n. 1, p. 59-68, 2011.

CURRY, C. H.; MCCARTHY, J. S.; DARRAGH, H. M.; WAKE, R. A.; TODHUNTER, R.; TERRIS, J. Could tourist boot act as a vector for disease transmission in Antarctica? **Journal of Travel Medicine**, v. 9, p. 190-193, 2002.

CRADDOCK, S.; HANNOUN, C. Hong Kong flu (1968) revisited 40 years later. In: CRADDOCK, S.; GILES-VERNICK, T. (Ed.). **Influenza and public health: learning from past pandemics**. London: Earthscan, 2010.

DAS, K.; ARAMINI, J. M.; MA, L.; KRUG, R. M.; ARNOLD, E. Structure of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. **Nature Structural Molecular Biology**, v. 17, p. 530-538, 2010.

DELANGUE, J.; SANCHEZ, Y. R.; PIORKOWSKI, G.; BESSAUD, M.; BARONTI, C.; THIRION-PERRIER, L.; MAFAYLE, R. L.; ARDAYA, C. A.; AGUILERA, G. A.; GUZMAN, J. R.; RIERA, J. L.; de LAMBALLERIE, X. Viral aetiology influenza like illnesses in Santa Cruz, Bolivia (2010–2012). **Virology Journal**, v. 11, n. 35, p. 1-11, 2014.

EVEGANG, C.; STENHOUSE, I. J.; PHILIPS, R. A.; PETERSEN, A.; FOX, J. W.; SILK, J. R. D. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 5, p. 2078-2081, 2010.

ELLIS, T. M.; BOUSFIELD, R. B.; BISSETT, L. A.; DYRTING, K. C.; LUK, G. S. M.; TSIM, S. T.; STURM-RAMIREZ, K.; WEBSTER, R. G.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. **Avian Pathology**, v. 33, n. 5, p. 492-505, 2004.

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

FEREIDOUNI, S. R.; WERNER, O.; STARICK, E.; BEER, M.; HARDER, T. C.; AGHAKHAN, M.; MODIRROUSTA, H.; AMINI, H.; MOGHADDAM, M. K.; BOZORGHMEHRIFARD, M. H. *et al.* Avian influenza vírus monitoring in wintering waterbirds in Iran, 2003-2007. **Virology Journal**, v. 7, n. 43, p. 1-14. 2010.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2007. **Wild birds and avian influenza: an introduction to applied field research and disease sampling techniques**. Rome: FAO, 2007.115p.

FURNESS, R. W.; BONAN, A. Brown Skua (*Catharacta antarctica*). In: DEL HOYO, J.; ELLIOTT, A.; SARGATAL, J.; CHRISTIE, D. A.; DE JUANA, E. (Ed.). **Handbook of the Birds of the World Alive**. Barcelona: Lynx Editions, 2013. Disponível em: <<http://www.hbw.com/node/53956>> Acesso em: 17 maio 2014.

GAIDET, N.; EL MAMY, A.B.O.; CAPPELLE, J.; CARON, A.; CUMMING, G. S.; GROSBOIS, V.; HAMMOUMI, P. G. S.; ALMEIDA, R. S.; FEREIDOUNI, S. R.; CATTOLI, G.; ABOLNIK, C.; MUNDAVA, J.; FOFANA, B.; NDLOVU, M.; DIAWARA, Y.; HURTADO, R.; NEWMAN, S. H.; DODMAN, T.; BALANCA, G. Investigating Avian Influenza Infection Hotspots in Old-World Shorebirds. **PLOS One**, v. 7, n. 9, p. 1-12, 2012.

GAN, S. D.; PATEL, K. R. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. **The Society for Investigative Dermatology**, v. 133, p. 1-3, 2013.

GOOGLE EARTH. Version. 5.0.11733.9347. Software. 2009.

HALL, T. A. BioEdit: a user friend biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series: Oxford Journals**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HARRIS, C. M.; CARR, R.; LORENZ, K.; JONES, S. **Important bird area in Antarctic Peninsula, South Shetland Islands, South Orkney Islands** – Final Report. Cambridge, Great Britain: Environmental Research, Assessment Ltd., 2011. 226 p.

HARRIS, C. M. **Wildlife awareness manual: Antarctic Peninsula, South Shetland Island, South Orkney Islands**. Cambridge: UK Foreign, Commonwealth Office and HMS Endurance, 2006. 138 p.

HAUSE, B. M.; COLLIN, E. A.; LIU, R., et al. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the *Orthomyxoviridae* Family. **MBio**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2014

HEADLAND, R.K. 1989. **Chronological List of Antarctic expeditions and related historical events**. Cambridge, Great Britain: Cambridge University Press, 1989. 733p.

HENAUX, V.; PALMLEY, J.; SOOS, C.; SAMUEL, M. D. Estimating transmission of avian influenza in wild birds from incomplete epizootic data: implications for surveillance and disease spread. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, n. 1, p. 223-231, 2013.

HILL, S. L.; PHILIPS, T.; ATKINSON, A. Potential Climate Change Effects on the Habitat of Antarctic Krill in the Weddell Quadrant of the Southern Ocean. **PLOS One**, v. 8, n. 9, p. 1-12, 2013.

HINSHAW, V. S.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G.; REHG, J. E.; FIORELLI, P.; EARLY, G.; GERACI, J. R.; AUBIN, D. J. ST. Are Seals Frequently Infected with Avian Influenza Viruses? **Journal of Virology**, v. 51, n. 3, p. 863-865, 1984.

HOYE, B. J.; MUNSTER, V. J.; NISHIURA, H.; FOUCHIER, R. A. M.; KLAASSEN, J. M.; KLAASSEN, M. Reconstructing an annual cycle of interaction: natural infection and antibody dynamics to avian influenza along a migratory flyway. **Oikos**, 000:001-008, 2010.

HUANG, K.; ZHU, H.; FAN, X.; WANG, J.; CHEUNG C.; DUAN, L.; HONG, W.; LIU, Y.; LI, L.; SMITH, D.K.; CHEN, H.; WEBSTER, R. G.; WEBBY, R. J.; PEIRIS, M.; GUAN Y. Establishment and lineage replacement of H6 influenza viruses in domestic ducks in southern China. **Journal of Virology**. 2012. doi:10.1128/JVI.06389-11.

HURT, A. C.; VIJAYKRISHNA, D.; BUTLER, J. et al. Detection of evolutionary distinct avian influenza A virus in Antarctica. **MBio**, v. 5, n. 3, p. 1-9, 2014.

HURTADO, R. F. **Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia**. 2013. 124 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

HURTADO, R. F.; SERAFINI, P. P.; VANSTREELS, R. E. T.; OLSEN, K. M.; DURIGON, E. L. Northernmost record of brown skua *Stercorarius antarcticus* (Lesson, 1831) at Maranhão state, Northern Brazil. **Boletín Chileno de Ornitología**, v. 18, n. 1-2, p. 52-56, 2012.

HUTCHINSON, E. C.; FODOR, E. Transport of influenza virus genome from nucleus to nucleus. **Viruses**, v. 5, p. 2424-2446, 2013.

IDEXX Laboratories. Validation data report. **Report**. Estados Unidos, 2012.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. 2014. Disponível em: <http://antartica.cptec.inpe.br/~rantar/PDF/Queda_Temp_Ferraz.pdf> Acesso em: 08 ago. 2014.

INTERNATIONAL WHALLING COMMISSION. 2014. Disponível em: <<http://iwc.int/lives>> Acesso em: 13 maio 2014.

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

IUCN. International Union for Conservation of Nature. 2014. Disponível em: <<http://www.iucn.org/knowledge/tools/tools/>>. Acesso em: 15 ago 2014.

KAWAOKA, Y. Orthomyxoviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams, Wilkins, 2007. 1692-1732 p.

KERRY, K.; RIDDLE, M. **Health of Antarctic wildlife - A challenge for science and policy**. London: Springer Science + Business Media, 2009.

KERRY, K.; RIDDLE, M.; CLARKE, J. Outbreaks of disease in Antarctica and the sub-Antarctic Islands In: KERRY, K.; RIDDLE, M.; CLARKE, J. **Diseases of Antactic wildlife: a report**. Australia. Australian Antarctic Division. 1998.

KILLBOURNE, E. D. Influenza pandemics of the 20th century. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 9-14, 2006.

KITTELBERGER, R.; MCFADDEN, A. M. J.; HANNAH, M. J.; JENNER, J.; BUENO, R.; WAIT, J.; KIRKLAND, P. D.; DELBRIDGE, G.; HEINE, H. G.; SELLECK, P. W.; PEARCE, T. W.; PIGOTT, C. J.; O'KEEFE, J. S. Comparative evaluation of four competitive/blocking ELISAs for the detection of influenza A antibodies in horses. **Veterinary Microbiology**, p. 1-7, 2010.

LEBARBENCHON, C.; BROWN, J. D.; LUTTRELL, M. P.; STALLKNECHT, D. E. Comparison of two commercial enzyme-linked immunosorbent assays for detection of *Influenza A virus* antibodies. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 24, n. 1, p. 161-165, 2012.

LEWIS, N. S.; JAVAKHISHVILI, Z.; RUSSELL, C. A.; MACHABLISHVILI, A.; LEXMOND, P.; VERHAGEN, J. H.; VUONG, O.; NASHVILI, T.; DONDUASHVILI, M.; SMITH, D. J.; FOUCHIE, R. A. M. Avian Influenza Virus Surveillance in Wild Birds in Georgia: 2009–2011. **PLOS One**, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2013.

LI, Q.; SUN, X.; LI, Z.; LIU, Y.; VAVRICKA, C. J.; QI, J.; GAO, G. Structural and functional characterization of neuraminidase-like molecule N10 derived from bat influenza A virus. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 109, n. 46, p. 18897-18902, 2012.

LIFE TECHNOLOGIES. 2014. Disponível em: <http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/brochures/Consumables-Product-Selection-Guide.pdf>. Acesso em: 03 agosto 2014.

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

MAINES, T. R.; SZRETTER, K. T.; PERRONE, L.; BELSER, J. A.; BRIGHT, R. A.; ZENG, H.; TUMPEY, T. M.; KATZ, J. M. Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response. **Immunological Reviews**, v. 225, p. 68-84, 2008.

MARINHA DO BRASIL. 2012. Disponível em: www.mar.mil.br/diversos/Boletim/2012/fevereiro/bn_29022012.pdf Acesso em: 15 maio 2012.

MARTÍNEZ, I.; CHRISTIE, D. A.; JUTGLAR, F.; GARCIA, E. F. J. 2014. *Sphenisciformes* Order. In: DEL HOYO, J.; ELLIOT, A.; SARGATAL, J.; CHRISTIE, D. A.; DE JUANA, E. (Ed.) **Handbook of the Birds of the World Alive**. Barcelona: Lynx Edicions, 2014. Disponível em: <http://www.hbw.com/node/52458> Acesso em: 17 maio 2014.

MARZOF, S. L.; QUINTANA, R. D. Diet of the south polar skua *Catharacta maccormicki* and the brown skua *C. antarctica lonnbergi* at Cierva Point, Antarctic Peninsula. **Polar Biology**, v. 31, p. 827-835, 2008.

MCGONIGAL, D. **Antarctica – Secrets of the Southern Continent**. Portland: Global Book Publishing Pty Ltd, 2009. 204 p.

MEDINA, R. A.; GARCIA-SASTRE, A. Influenza A vírus: new research developments. **Nature**, v. 9, p. 590-603, 2011.

MILLER, G. G.; WATTS, J. M. SHELLAM, G. R. Viral antibodies in polar skuas around Davis Station, Antarctica. **Antarctic Science**, v. 20, n. 5, p. 455-461, 2008.

MINH, P. Q. **Epidemiological studies of Highly Pathogenic Avian Influenza in Vietnam**. 2010. 225 p. [Ph.D. thesis] Massey University, Palmerstone North, New Zealand, 2010.

MORGAN, I. R.; WEBSTER, H. A. Virological studies in Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. **Avian Diseases**, v. 25, n. 4, p. 1019-1026, 1981.

MORGAN, I. R.; WESTBURY, H. A. Studies of viruses in penguins of Vestfold Hills. **Hydrobiologia**, v. 165, p. 263-269, 1988.

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

MUNSTER V. J.; BAAS C.; LEXMOND P.; WALDENSTROM M. J.; WALLENSTEN ET AL. A.; et al. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. **Public Library of Science Pathology**, v. 3, n. 5, p. 1-9, 2007.

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

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

NAROSKY, T.; YZURIETA, D. **Aves de Patagonia y Antartida**. Buenos Aires: Vazquez Mazzini, 2004. 144 p.

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

NEUMANN, G.; TAKESHI, N.; KAWAOKA, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. **Nature**, v. 459, p. 931-939, 2009.

OLDSTONE, M. B. A. **Viruses, plagues, history – past, present, and future**. Oxford: Oxford University Press, 2010. 400 p.

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

OTLEY, H.; REID, T.; PHILIPS, R.; WOOD, A.; PHALAN, B.; FORSTER, I. Origin, age, sex and breeding status of wandering albatrosses (*Diomedea exulans*), northern (*Macronectes halli*) and southern giant petrels (*Macronectes giganteus*) attending demersal longliners in Falkland Islands and Scotia Ridge waters, 2001–2005. **Polar Biology**, v. 30, n. 3, p. 359-368, 2007.

PALESE, P. Orthomyxoviruses: Their viruses and their replication. In. KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams, Wilkins, 2007. 1648-1678 p.

PATTERSON, D.; WOHLER, E. J.; CROXALL, J. P.; COOPER, J.; PONCET, S.; FRASER, W. R. Breeding distribution and population status of the Northern Giant Petrel (*Macronectes halli*) and South Giant Petrel (*Macronectes giganteus*). **Marine Ornithology**, v. 36, p. 115-124, 2008.

PATTERSON, D. L.; HUNTER, S. Giant Petrel *Macronectes* spp. band recovery analyses from the international Giant Petrel Banding Project, 1988/89. **Marine Ornithology**, v. 28, p. 70-74, 2000.

PEARCE, D.; WILSON, W. H. Review: viruses in Antarctic ecosystems. **Antarctic Science**, v.15, n. 3, p. 319-331, 2003.

PEÑA, M. F.; POULIN, E.; DANTAS, G. P. M.; GONZALEZ-ACUÑA, D.; PETRY, M. V.; VIANNA, J. A. Have historical climate change affected gentoo penguin *Pygoscelis papua* population in Antarctica? **PLOS One**, v. 9, n. 4, p. 1-9, 2014.

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

POTTER, C. W. A history of Influenza. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 571-579, 2001.

RADFORD, A. D.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A. C.; HALL, N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 1853-1868, 2012.

RAMBAUT, A. **FigTree**. 2007. Disponível em: <tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Acesso em: 22 jul. 2014.

REED, K. D.; MEECE, J. K.; HENKEL, J. S.; SHUKLA, S. K. Birds, Migrations and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. **Clinical Medicine, Research**, v. 1, n. 1, p. 5-12, 2003.

REINHARDT, K.; HAHN, S.; PETER, H.-U.; WEMHOFF, H. A review of the diets of Southern Hemisphere skuas. **Marine Ornithology**, v. 28, p. 7-19, 2000.

REPERANT, L. A.; FUCKAR, N. S.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; DOBSON, A. P.; KUIKEN, T. Spatial and temporal association of outbreaks of H5N1 influenza virus infection in wild birds with the 0°C isotherm. **PlosPathogens**, v. 6, n. 4, p. 1-9, 2010.

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

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

SÃO PAULO. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2009. Disponível em: <portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/influenza_ah1n1_13062009.pdf> Acesso em: 25 maio 2012.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON ANTARCTIC RESEARCH. 2008. Disponível em: <www.scar.org/treaty/> Acesso em: 20 dez. 2008.

SCHNITZLER, S. U.; SCHNITZLER, P. An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. **Virus genes**, v. 39, p. 279-292, 2009.

SECRETARIA DA COMISSÃO INTERMINISTERIAL PARA OS RECURSOS DO MAR. 2014. Disponível em: <<https://www.mar.mil.br/secirm/licitacoes.html>> Acesso em: 14 maio 2014.

_____. 2012. Disponível em: <www.mar.mil.br/secirm/proantar.htm> Acesso em: 15 maio 2012.

SIGRIST, T. **Avifauna Brasileira – guia de campo Avis Brasilis**. São Paulo: Avis Brasilis, 2013. 592p.

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

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

SPACKMAN, E.; SENNE, D. A.; MYERS, T. J.; BULAGA, L. L.; GARBER, L. P.; PERDUE, M. L.; LOHMAN, K.; DAUML, T.; SUAREZ, D. L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3256-3259, 2002.

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

SRIWILAIJAROEN, N.; SUZUKI, Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. **Proceedings of the Japan Academy**, v. 88, p. 226-249, 2012.

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

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

STORCH, G. A. Diagnostic Virology. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams, Wilkins, 2007. 566-598 p.

STRECK, A. F.; GAVA, D.; RECH, H.; CANAL, C. W. Técnicas de diagnóstico imunológico em suinocultura. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 125-130, 2007.

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

SUGIMOTO, L. Gripe aviária: fórum reacende debate para sensibilizar governo. *Jornal da Unicamp, Universidade Estadual de Campinas*, n. 340, p. 3, 2006.

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

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

SWOFFORD, D. L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. The pathology of avian influenza viruses. **Annual Review of Pathology**, v. 3, p. 499-522, 2008.

TELINO JR, W. R.; NEVES, R. M. L.; FARIAS, G. B.; BRITO, M. T.; PACHECO, G.; SIQUEIRA, S. A. O. Ocorrência e aspectos comportamentais da poma-antártica *Chionis alba* (Charadriiformes: Chionididae 2001), em Pernambuco, Brasil. **Tangara**, v. 1, n. 1, p. 26-29, 2001.

TEMPLETON, K. E.; SCHELTINGA, S. A.; BEERSMA, M. F. C.; KROES, A. C. M.; CJAAS, E. C. J. 2004. Rapid and sensitive method using Multiplex Real Time PCR for diagnosis of infection by influenza A and influenza B viruses respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3 and 4. **J. Clin. Microb.**, v. 42, n. 4, p. 1564-1569.

THOMAZELLI, L. M.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, D. B.; SANFILIPPO, L.; FERREIRA, C. S.; BRENTANO L.; PELIZARI V. H.; NAKAYAMA C.; DUARTE, R.; HURTADO, R.; BRANCO, J. O.; WALKER, D.; DURIGON, E. L. Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region. **Veterinary Microbiology**, v. 146, p. 155–160, 2010.

TIN, T.; FLEMING, Z. L.; HUGHES, K. A.; AINLEY, D. G.; CONVEY, P.; MORENO, C. A.; PFEIFFER, S.; SCOTT, J.; SNAPE, I. Review: Impacts of local human activities on the Antarctic environment. **Antarctic Science**, v. 21, n. 1, p. 3-33, 2009.

TSE, M.; KIM, M.; CHAN, C.; HO, P.; MA, S.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M. Evaluation of Three Commercially Available Influenza A Type-Specific Blocking Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Seroepidemiological Studies of Influenza A Virus Infection in Pigs. **Clinical and Vaccine Immunology**, p. 334-337, 2011.

TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLHO, D. A. A.; CHEN, L.; RECUENCO, S.; ELLISON, J. A.; DAVIS, C. T.; YORK, I. A.; TURMELLE, A. S.; MORAN, D.; ROGERS, S.; SHI, M.; TAO, Y.; WEIL, M. R.; TANG, K.; ROWE, L. A.; SAMMONS, S.; XU, X.; FRACE, M.; LINDBLADE, K. A.; COX, N. J.; ANDERSON, L. J.; RUPPRECHT, C. E.; DONIS, R. O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 190, n. 11, p. 4269-4274, 2012.

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; YANG, H.; CHEN, X.; RECUENCO, S.; GOMEZ, J.; CHEN, L.; JOHNSON, A.; TAO, Y.; DREYFUS, C.; YU, W.; MCBRIDE, R.; CARNEY, P. J.; GILBERT, A. T.; CHANG, J.; GUO, Z.; DAVIS, C. T.; PAULSON, J. C.; STEVENS, J.; RUPPRECHT, C. E.; HOLMES, E. C.; WILSON, I. A.; DONIS, R. O. New World bats harbor diverse influenza A viruses. **PLOS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 1-12, 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL. 2012. Disponível em: <www.ufrgs.br/antartica/index.htm> Acesso em: 15 maio 2012.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO. 2012. Disponível em: <www.ufrj.br/mostraNoticia.php?noticia=12737_Pesquisadora-da-UFRJ-comenta-impacto-do-incendio-na-Antartica.html> Acesso em: 15 maio 2012.

UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DO SINOS. 2012. Disponível em: <unisinos.br/blogs/biologia/tag/pesquisa/>. Acesso em: 17 maio 2012.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. 2012. Instituto de Geociências. Disponível em: <www.igc.usp.br/cpa/proantar.html> Acesso em: 15 maio 2012.

VON MATTER, S. F.; STRAUBE, F. C.; ACOORD, I. A.; PIACENTINE, V. Q.; CÂNDIDO, J. F. **Ornitologia e conservação**: ciências aplicadas, técnicas de pesquisa e levantamento. Rio de Janeiro-RJ: Technical Books, 2010. 516 p.

WALLENSTEN ET AL., A. T.; MUNSTER, V. J.; LATORRE-MARGALEF, N.; BRYTTING, J.; FOUCHIER, R. A. M. *et al.* Surveillance of Influenza A virus in migratory waterfowl in Northern Europe. **Emerging Infectious Diseases** v. 13, n. 3. p. 404-411, 2007.

WALLENSTEN ET AL., A.; MUNSTER, V. J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; WALDENSTROM, J.; BONNEHAHL, J.; BROMAN, T.; FOUCHIER, R. A. M.; OLSEN, B. Mounting evidence for the presence of influenza A virus in avifauna of Antarctic region. **Antarctic Science**, v. 18, p. 353-356, 2006.

WANG, T. T.; PALESE, P. Unraveling the mystery of swine Influenza virus. **Cell**, v.137, n.6, p.983-985, 2009.

WEBSTER, R. G.; HINSHAW, V. S.; BEAN, W. J.; VAN WYKE, K. L.; GERACI, J. R.; ST. AUBIN, D. J.; PETURSSON, G. Characterization of an influenza A virus from seals. **Virology**, v. 113, n. 2, p. 712-734, 1981.

WILSON, H. M.; HALL, J. S.; FLINT, L.; FRANSON, J. C.; ELY, C. R.; SCHMUTZ, J. A.; SAMUEL, M. D. High Seroprevalence of Antibodies to Avian Influenza Viruses among Wild Waterfowl in Alaska: Implications for Surveillance. **PLOS One**, v. 8, n. 3, p. 1-7, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2012. Disponível em:
<www.who.int/zoonoses/emerging_zoonoses/en/> Acesso em: 28 maio 2012.

_____. **Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza**. Geneva: WHO Press, 2011.139 p.

_____. **Collecting, preserving and shipping specimens for the diagnosis of avian influenza A (H5N1) virus infection – Guide for field operations**. Geneva: WHO Press, 2006. 83 p.

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

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. 2010. Disponível em:
<http://web.oie.int/eng/normes/mcode/en_chapitre_1.10.4.htm> Acesso em: 06 ago 2014.

WOODS, R.; JONE, H. I.; WATTS, J.; MILLER, G. D.; SHELLAM, G. R. 2009. Disease of Antarctic Seabirds. In: KERRY, K. R.; RIDDLE, M. J. (Ed.). **Health of Antarctica Wildlife- A challenge for Science and policy**. Heidelberg, Germany: Springer, 2009. 469p.

YOUNG, E. **Skuas and Penguins: predator and prey**. Cambridge: Cambridge University Press, 1994. 444 p.

ZHANG, G.; SHOHAN, D.; GILICHINSKY, D.; DAVYDOV, S.; CASTELLO, J.; ROGERS, S. O. Evidence of Influenza A Virus RNA in Siberian Lake Ice. **Journal of Virology**, v. 80, n. 24, p. 12229-12235, 2006.

APÊNDICE – Lista das amostras positivas por sorologia. Em negrito, as amostras que também foram positivas por biologia molecular.

Amostra	Espécie	Local	Data	Sorologia
AB 09	pinguim-antártico	Ilha Rei George	30/12/2010	0.186
AB 17	pinguim-antártico	Ilha Rei George	30/12/2010	0.260
AE 17	pinguim-antártico	Ilha Elefante	29/12/2010	0.188
AE 23	pinguim-antártico	Ilha Elefante	29/12/2010	0.536
AE 24	pinguim-antártico	Ilha Elefante	29/12/2010	0.304
AE 25	pinguim-antártico	Ilha Elefante	29/12/2010	0.313
AE 26	pinguim-antártico	Ilha Elefante	29/12/2010	0.371
AE 28	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.211
AE 29	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.105
AE 30	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.422
AE 31	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.224
AE 32	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.136
AE 33	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.128
AE 34	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.162
AE 35	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.314
AE 36	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.132
AE 37	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.195
AE 38	skua-subantártica	Ilha Elefante	31/12/2010	0.125
AE 63	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/01/2011	0.177
AE 64	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/01/2011	0.167
AE 65	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/01/2011	0.137
AE 66	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/01/2011	0.171
AE 67	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/01/2011	0.145
AE 68	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/01/2011	0.113
AE 69	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/01/2011	0.120
AE 82	skua-subantártica	Ilha Elefante	05/01/2011	0.109
AE 83	skua-subantártica	Ilha Elefante	05/01/2011	0.119
AE 84	skua-subantártica	Ilha Elefante	05/01/2011	0.116
AE 85	skua-subantártica	Ilha Elefante	05/01/2011	0.107
AE 157	pinguim-antártico	Ilha Elefante	21/01/2011	0.127
AE 158	pinguim-antártico	Ilha Elefante	21/01/2011	0.121
AE 176	pinguim-antártico	Ilha Elefante	23/01/2011	0.398
AE 178	pinguim-antártico	Ilha Elefante	23/01/2011	0.148
AB 126	pinguim-de-Adelie	Ilha Rei George	01/12/2011	0.208
AE 292	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.163
AE 296	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.326
AE 297	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.165

Amostra	Espécie	Local	Data	Sorologia
AE 298	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.417
AE 299	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.277
AE 301	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.331
AE 306	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.498
AE 307	pinguim-antártico	Ilha Elefante	01/11/2011	0.182
AE 312	pinguim-antártico	Ilha Elefante	02/11/2011	0.431
AE 327	pinguim-antártico	Ilha Elefante	02/11/2011	0.424
AE 333	pinguim-antártico	Ilha Elefante	03/11/2011	0.212
AE 339	pinguim-antártico	Ilha Elefante	05/11/2011	0.284
AE 436	pinguim-antártico	Ilha Elefante	25/11/2011	0.207
AE 440	pinguim-antártico	Ilha Elefante	25/11/2011	0.353
AE 448	pinguim-antártico	Ilha Elefante	26/11/2011	0.199
AE 449	pinguim-antártico	Ilha Elefante	26/11/2011	0.395
AE 450	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/12/2011	0.152
AE 451	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/12/2011	0.116
AE 452	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/12/2011	0.102
AE 453	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/12/2011	0.115
AE 454	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/12/2011	0.107
AE 455	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/12/2011	0.117
AE 456	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/12/2011	0.143
AE 457 (=AE766)	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.117
AE 458	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.315
AE 459	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.115
AE 461	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.113
AE 462	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.121
AE 463	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.132
AE 464	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.115
AE 465	skua-subantártica	Ilha Elefante	20/12/2011	0.117
AE 466	skua-subantártica	Ilha Elefante	27/12/2011	0.159
AE 467	skua-subantártica	Ilha Elefante	27/12/2011	0.137
AE 468	skua-subantártica	Ilha Elefante	27/12/2011	0.091
AE 469	skua-subantártica	Ilha Elefante	27/12/2011	0.181
AE 470	skua-subantártica	Ilha Elefante	27/12/2011	0.115
AE 471	skua-subantártica	Ilha Elefante	27/12/2011	0.170
AE 472	skua-subantártica	Ilha Elefante	27/12/2011	0.172
AE 473	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.122
AE 474	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.137
AE 475	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.098
AE 476(=AE766)	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.092

Amostra	Espécie	Local	Data	Sorologia
AE 477	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.113
AE 478 (=AE770)	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.147
AE 479	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.399
AE 480	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.118
AE 481	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.176
AE 482	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.154
AE 483	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.103
AE 484	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2011	0.099
AE 594	pinguim-antártico	Ilha Elefante	26/11/2012	0.313
AE 596	pinguim-antártico	Ilha Elefante	26/11/2012	0.153
AE 597	pinguim-antártico	Ilha Elefante	26/11/2012	0.171
AE 607	pinguim-antártico	Ilha Elefante	26/11/2012	0.221
AE 766 (=AE457)	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.117
AE 769 (=AE476)	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.128
AE 770 (=AE478)	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.124
AE 771	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.090
AE 772	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.143
AE 773	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.140
AE 774	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.085
AE 775	skua-subantártica	Ilha Elefante	29/12/2012	0.096
AE 777	skua-subantártica	Ilha Elefante	30/12/2012	0.126
AE 778	skua-subantártica	Ilha Elefante	30/12/2012	0.133
AE 779	skua-subantártica	Ilha Elefante	30/12/2012	0.116
AE 780	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/01/2013	0.092
AE 781	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/01/2013	0.119
AE 783	skua-subantártica	Ilha Elefante	17/01/2013	0.089
AE 784	skua-subantártica	Ilha Elefante	02/02/2013	0.180
AE 785	skua-subantártica	Ilha Elefante	03/02/2013	0.148
AE 787	skua-subantártica	Ilha Elefante	14/02/2013	0.104
AE 789	skua-subantártica	Ilha Elefante	14/02/2013	0.177
AE 791	skua-subantártica	Ilha Elefante	14/02/2013	0.399
AE 792	skua-subantártica	Ilha Elefante	14/02/2013	0.083
Média dos controlos positivos		-	-	0.273
Média dos controlos negativos		-	-	1.326
Ponto de corte (<i>cut off</i>)		-	-	< 0.500

*D.O.: Densidade Óptica; = : recaptura de ave