

ADELIA HIROKO NAGAMORI KAWAMOTO

**Caracterização molecular e sorológica da
Influenza A isoladas de aves residentes,
silvestres e migratórias no
estado de São Paulo**

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

São Paulo
2013

ADELIA HIROKO NAGAMORI KAWAMOTO

**Caracterização molecular e sorológica da
Influenza A isoladas de aves residentes,
silvestres e migratórias no
estado de São Paulo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Doutor 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 Dissertação da USP(BDTD).

São Paulo
2013

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

Kawamoto, Adelia Hiroko Nagamori.

Caracterização molecular e sorológica da influenza A isoladas de aves residentes, silvestres e migratórias no estado de São Paulo / Adelia Hiroko Nagamori Kawamoto. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Influenza A de aves silvestres, residentes e migratórias.

Versão do título para o inglês: Molecular and serological characterization of influenza A isolated from wild, migratory and resident birds in the state of São Paulo.

1. Influenza A em aves 2. Influenza A em aves migratórias
3. Influenza A subtipos H₃N₂ 4. Aves silvestres 5. Influenza A em aves migratórias 6. Vírus da influenza A em aves brasileiras I. Durigon, Prof. Dr. Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB063/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Adelia Hiroko Nagamori Kawamoto.

Título da Tese: Caracterização molecular e sorológica da influenza A isoladas de aves residentes, silvestres e migratórias no estado de São Paulo.

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

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

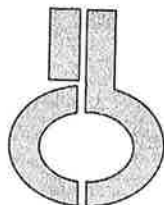
Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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

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

Decl. CEEA. 068.2009

DECLARAÇÃO

Em adendo ao certificado 117/08/CEP, aprovado em 19.11.08, informo que o Protocolo: *"Subtipagem, sequenciamento e análise filogenética das amostras de influenza A isoladas de aves residentes, silvestres e migratórias no Estado de São Paulo"* terá a orientação do Prof. Dr. Edison Luiz Durigon.

São Paulo, 29 de outubro de 2009.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEEA- ICB/USP

Dedico este trabalho àqueles que
serviram de modelo para
minha formação,
meus pais

Motoyuki Nagamori e Misae Takamori
(in memoriam)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Edison Luiz Durigon e à Dra. Danielle Bruna Leal de Oliveira Durigon meu eterno agradecimento. Suas ajudas foram importantes para finalização deste estudo.

À Dra. Dalva Assunção Portari Mancini, Diretora de Virologia e Chefe da Seção de Vírus da Influenza do Instituto Butantan, que nos colocou à disposição o laboratório dando o suporte técnico e científico, bem como fornecendo Soros Imunes, Culturas Celulares e equipamentos para realização da parte experimental do meu trabalho.

Às minhas amigas Rita Zucatelli Mendonça, Rosely Cabette B. Alves, Aparecida Santos Pietro Pereira e Luzia da Purificação não tenho palavras de agradecimentos. Deus os abençoe.

À Dra Aurora Marques Cianciarullo da Seção de Microscopia Eletrônica do Instituto Butantan que gentilmente realizou a identificação morfológica dos vírus em microscopia eletrônica.

À equipe de campo da Seção de Vírus Transmitidos por Artrópodos do Instituto Adolfo Lutz Dr. Luiz Eloy Pereira, pesquisadora Akemi Suzuki e Sr Renato Pereira Souza que nos colocou à disposição para captura, coletas das amostras de aves e classificação das espécies.

Às pesquisadoras Aurea S. Cruz, Tamiko I. Ikeda e à Eliane Moreira da Seção de Cultura Celular do Instituto Adolfo Lutz, pelo fornecimento, parcial, das células MDCK e NCI H292 para cultivo viral.

À Dulce Maria de Souza pelas valiosas sugestões na elaboração da minha tese de mestrado pela nossa grande amizade (in memoriam).

Aos Prof. Dr. Ivo Lebron e Prof. Dr. Paulo Lee Ho, que foram pessoas imprescindíveis para finalização deste estudo.

À Aquila Maria Lourenço Gomes da Divisão dos Serviços Básicos. Aos funcionários do Setor de Reparo de Vidraria do Instituto Adolfo Lutz, pela elaboração de pipetas "pasteur" e "loops" para coleta de amostras.

Ao Dr. José Augusto Barbosa, Medico Veterinário responsável pelos Serviços de Biotério do Instituto Adolfo Lutz, pelo seu inestimável apoio, e pela gentileza cedendo o sangue de cobaia para os testes laboratoriais.

Aos funcionários da Biblioteca que contribuíram na elaboração, na revisão textual e no apoio e suporte de informática destas diretrizes.

Às minhas amigas incentivaram na elaboração deste trabalho, Clarice Pinto Máximo Espindola, Iray Maria Rocco e Esther L.B. Chamelet.

Aos colegas do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Seção de Virologia do Instituto Biomédicas da Universidade de São Paulo: Sr. José Maria Lopes, Sr Carlos Augusto da Silva, Jansen, Tatiana, Angélica, Erica, Marina e Gustavo pela cooperação e carinho com que sempre nos agraciaram.

Ao Dr. Luciano Matsumya Tomazelli, funcionário do Laboratório de Virologia ICBII-USP, pelo ensinamento das técnicas de Biologia Molecular que foram preciosos para concretização deste estudo.

Sra. Naide Rodrigues Farripas toda a dedicação e compreensão dispensadas aos nos alunos.

Ao Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho, do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, pela elaboração das imagens de efeitos citopáticos das células.

Ao Sr. Mario Nakano, pela doação dos galos e a Biovet pelo fornecimento de ovos embrionados utilizados nos testes laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Victor Arana Chaves do Departamento de Histologia do Instituto Biomédicas pelo auxílio prestado na confecção das fotomicrografias.

À Dra. Cristina Demetrio Médica Veterinária e Paula Beatriz pelo precioso auxílio, ao fornecer os nomes populares das espécies das aves com amostras positivas. A nossa parceria na publicação trabalho científica.

Agradeço à todos colegas e amigos que colaboraram de uma maneira direta e indireta para realização deste trabalho e pelo carinho demonstrado durante o desenvolvimento deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com recursos provenientes do Instituto Adolfo Lutz, Instituto Butantan, Ciências Biomédicas da USP. Por isso, agradeço pelo apoio financeiro e material os quais possibilitaram a execução desse trabalho.

Salmo 23

O senhor é meu pastor, nada me faltará.
Deitar-me faz em verdes pastos,
Guia-me mansamente às águas tranquilas;
Refrigera a minha alma,
Guia-me pelas veredas da justiça por amor do seu nome,
Ainda que andasse pelo vale da sombra da morte
Não temeria mal algum, porque tu estás comigo,
A tua vara e o teu cajado me consolam;
Preparas uma mesa perante mim na presença dos meus
Inimigos,
Unges a minha cabeça com óleo, o meu cálice transborda;
Certamente que a bondade e a misericórdia
Me seguirão todos os dias de minha vida,
E habitarei na casa do Senhor por longos dias.

Amém.

RESUMO

KAWAMOTO, A. H. N. **Caracterização molecular e sorológica da influenza A isoladas de aves residentes, silvestres e migratórias no estado de São Paulo.** 2013. 96 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O Vírus de Influenza aviária pertence à família *Orthomyxoviridae*. Nos últimos anos vários subtipos da gripe aviária de baixa patogenicidade têm causado surtos e epidemia em humanos e aves domésticas. As aves selvagens e migratórias participam da manutenção e transmissão interespecie dos 16 subtipos de hemaglutinina e 9 subtipos de Neuraminidase na natureza. Nosso estudo teve como objetivo subtipar as amostras positivas através de teste sorológico de inibição da hemaglutinação (HI) e técnica de Biologia Molecular. Foram positivas as amostras das espécies: *Elaenia mesoleuca* (2), *Sporophila lineola* (1) *Sporophila caerulescen* (1), *Vireo olivaceus* (3), *Columbina talpacoti* (3), *Paroaria dominicana* (2), foram coletadas das reservas experimentais de campo localizadas no Estado de São Paulo - Brasil, durante os anos de 1997 e 1998. Tais amostras foram identificadas por teste preconizado HI (de acordo com WHO) usando 20 soros imunes anti-influenza do tipo A e um do tipo B e análise de RT-PCR com sequenciamento do gene Hemaglutinina e Neuraminidase. O teste HI demonstrou que 12 amostras apresentaram estreita afinidade com soros imune A/HongKong/1/68 (H3N2), A/Equine/Miami/63 (H3N8) and A/Duck/Ukraine/63 (H3N8). As análises filogenéticas de sequenciamento do gene hemaglutinina e Neuraminidase desses isolados revelaram uma alta homologia com os do subtipos H3N2. As análises filogenéticas e as variabilidades genéticas em comparação com as sequências de GenBank representando diversos países, mostraram que nossas amostras apresentaram estreita homologia com os vírus do subtipos, Siena (1991) Victoria (1990), e Beijim (1989). A análise de amino ácido indicou apresentaram mutações do tipo não sinônimas no gene da Hemaglutinina (Y153F, K172A, K175A, T264I) e da Neuraminidase (T55S), exclusiva de nossas amostras quando comparadas com amostras de AIV de outros países. Nossas amostras quando analisadas à proteína NA, não apresentaram mutações nos aminoácidos E119V e N274Y que conferem resistência aos inibidores da Neuminidase do subtipo N2.

Palavras-chaves: Virus da Influenza A, Aves Silvestres. Subtipos H3N2 em aves silvestres e migratórias.

ABSTRACT

KAWAMOTO, A. H. N. **Molecular and serological characterization of influenza A isolated from wild, migratory and resident birds in the state of São Paulo**

2013. 96 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Avian Influenza virus belongs to Orthomyxoviridae family. The last years several low pathogenic avian influenza subtypes have caused outbreaks and epidemic in human and poultry. The wild and migrating birds may be participating of maintenance and interspecies transmission of the 16 subtypes of the Hemagglutinin and 9 Neuraminidase in nature. Our study aimed subtyping samples positive by serological test haemagglutination inhibition (HI) technique and Molecular Biology. The samples from species *Elaenia mesoleuca* (2), *Sporophila lineola* (1) *Sporophila caerulescens* (1), *Vireo olivaceus* (3), *Columbina talpacoti* (3), *Paroaria dominicana* (2), were collected in reserves and experimental field stations located in the São Paulo State - Brazil, during the years 1997 and 1998. The samples were identified by HI test (according WHO) using the 20 antibody patterns anti-influenza A type and one for the influenza type B and RT-PCR and Sequence analysis of Hemagglutinin and Neuraminidase gene. The HI test demonstrated that 12 samples presented an antigenic close relationship with A/HongKong/1/68 (H3N2), A/ Equine/Miami /63 (H3N8) and A/Duck/ Ukraine/ 63 (H3N8) antiserum. The sequencing analyses of Hemagglutinin and Neuraminidase gene of these 12 isolates revealed a high homology with H3N2. Phylogenetic analysis and genetic variabilities compared with GenBank sequences representing several countries have shown that our samples showed a close homology with the virus subtypes Siena (1991) Victoria (1990) and Beijim (1989). Amino acid analysis indicated that there are non-synonymous mutations in the gene of hemagglutinin (Y153F, K172A, K175A, T264I) and neuramidase (T55S), exclusive of our samples compared to samples AIV other countries. Our samples when analyzed protein NA, showed no mutations in amino acids and E119V N274Y conferring resistance to inhibitors Neuraminidase subtype N2.

Keywords: Influenza Virus A, Migratory and Wild birds, Influenza vírus A H3N2 subtypes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Normas para nomenclatura do Vírus da Influenza, segundo o ICTV.....	17
Figura 2 - A figura demonstra a relação genética entre o vírus da Influenza suína, Aviários e humanos que contribuíram para o Flu A/H1N1pandêmico de 2009.	24
Figura 3 - Representação dos hospedeiros do vírus Influenza A e suas transmissões inter e intra espécies.....	26
Figura 4 - Árvore filogenética do vírus da influenza A, gene da NP.....	28
Figura 5 - Evolução da cepa H1N1 endêmica (S-OIV).....	31
Figura 6 - Microscopia eletrônica de contrastação negativa do Vírus da Influenza..	33
Figura 7 - Ilustração esquemática das estruturas de Orthomyxoviridae.....	34
Figura 8 - Estrutura tridimensional da proteína Neuraminidase.....	38
Figura 9 - Esquema de replicação do Vírus da Influenza (etapa 1).....	43
Figura 10 - Esquema da Replicação do Vírus da Influenza (etapa 2).....	43
Figura 11 - Locais de captura de aves silvestres.....	51
Figura 12 A e B - Técnica de captura des aves silvestres por rede de espera.....	52
Figura 13 - Representação do cronograma de trabalho utilizado na PCR da HA e NA.....	59
Figura 14 - Esquema representativo da Purificação do produto de PCR.....	60
Figura 15 - Visualização do produto de PCR da triagem de AIV NS1.....	65
Figura 16 - Topologia da árvore obtida do gene de HA.....	68
Figura 17 - Topologia da árvore do gene de NA	69
Figura 18 - Alinhamento de aminoácidos da proteína HA gene parcial.....	70
Figura 19 - Alinhamento de aminoácidos da proteína NA gene parcial.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados na reação da PCR para Triagem dos vírus de Influenza nas amostras estudadas.....	57
Tabela 2 - Total de amostras testadas em diferentes espécies de aves frequentadoras das estações experimentais de Guarulhos, Iguape e Juquitiba – SP. e porcentagem total de positividade de isolamento.....	62
Tabela 3 - Relação das amostras coletadas de espécies de aves Capturadas em diferentes áreas e tipos de habitat, com resultados positivos para o vírus da Influenza A.....	63
Tabela 4 - Identificação Sorológica pelo teste de Inibição de Hemaglutinação (HI) das amostras de aves em comparação aos anti soros e antígenos de Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2), A/equine/Miami/65 (H3N8) e A/duck/Ukraine/63 (H3N8) como controle negativo Influenza tipo B/Lee/40.....	64
Tabela 5 - Demonstra o resultado da triagem (NS1) e tipagem (HA e NA).....	66
Tabela 6 - Sugestão da nomenclatura para as amostras positivas de acordo o quarto comitê internacional de nomenclatura realizado em 1980.....	66
Tabela 7 – Conjunto de amostras idênticas obtidas pelo alinhamento de nucleotídeos das sequencias brasileiras, utilizadas na análise filogenética pela proteína HA.....	67

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Definição	16
1.2 Classificação do vírus da Influenza	16
1.3 Nomenclatura do vírus da Influenza	17
1.4 Histórico	18
1.5 Estudo de Influenza A em aves no Brasil	19
1.6 O AIV patogênico para o homem	21
1.7 Reservatório de Influenza A	25
1.8 Evolução do vírus da Influenza	27
1.9 Propriedades do Vírus da Influenza	32
1.10 Genoma do vírus da Influenza A	33
1.10.1 A proteína polimerase básica 2 (PB2)	34
1.10.2 A proteína polimerase básica1 (PB1)	34
1.10.3 A proteína polimerase ácida (PA)	35
1.10.4 A nucleoproteína (NP)	35
1.10.5 Proteínas M1 e M2	35
1.10.6 As proteínas não estruturais (NS1 e NS2)	36
1.10.7 Hemaglutinina (HA)	36
1.10.8 A neuraminidase (NA)	37
1.11 Replicação viral	39
1.11.1 Adsorção	39
1.11.2 Penetração	40
1.11.3 Transcrição	41
1.11.4 Tradução	41
1.11.5 Brotamento	42
1.12 Variação antigênica	44
1.12.1 Os tipos “drift”	44
1.12.2 Os tipos “shift”	44
1.13 Patogenicidade	45
1.14 Infecções interespecies	45
1.15 Transmissão	46
1.16 Diagnósticos laboratoriais	47

1.16.1 Sistema de Cultivo Viral	47
1.16.2 Identificação do Vírus	48
2 OBJETIVO	50
3 MATERIAL E MÉTODOS	51
3.1 Regiões de coleta de amostras	51
3.1.1 Município de Guarulhos/SP	51
3.1.2 Município de Iguape/SP	52
3.1.3 Município de Juquitiba/SP	52
3.2 Captura das aves	52
3.3 Amostras	53
3.4 Caracterização sorológica do vírus da Influenza Aviária	54
3.4.1 Soros padrões utilizados na reação de HI para Subtipagem	54
3.4.2 Tratamento de Soros Padrões	54
3.4.3 Reação de Inibição de Hemaglutinação	54
3.5 Caracterização molecular do vírus da Influenza Aviária	55
3.5.1 Extração do RNA total	55
3.5.2 Obtenção do cDNA com primers Randômicos	56
3.5.3 Triagem das amostras para Vírus da Influenza	56
3.5.4. Análise dos produtos amplificados	57
3.6 Subtipagem dos vírus de Influenza A	57
3.6.1 Obtenção do cDNA com primers específicos	58
3.6.2 Amplificação da Hemaglutinina (HA) e Neuraminidas (NA)	58
3.6.3 Análise dos produtos amplificados	58
3.7 Sequenciamento das Proteínas HA e NA	59
3.7.1 Purificação dos produtos amplificados	59
3.7.2 Sequenciamento dos Genes HA e NA	60
3.8 Análises Filogenéticas das Proteínas HA e NA	61
3.8.1 Processamento e análise das sequências dos genes HA e NA	61
4 RESULTADOS	62
4.1 Total das amostras capturadas	62
4.2 Inibição de Hemaglutinação para caracterização de subtipos de influenza A	63
4.3 Caracterização Molecular das amostras de aves para tipagem e Subtipagem das amostras positivas isoladas de aves	64

4.3.1 PCR de triagem de Influenza A pela NS1	64
4.3.2 Tipagem pela Amplificação das proteínas HA e NA	65
4.4 Análise da variabilidade genética dos genes HA e NA	67
4.4.1 Construção das Árvores Filogenéticas	67
4.4.2 Análise da variabilidade de nucleotídeos inter e intra-grupo da HA e NA	69
4.4.3 Análise da variabilidade de aminoácidos da Hemaglutinina (HA).....	70
4.4.4 Análise da variabilidade de aminoácidos da Hemaglutinina (NA).....	71
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO – As espécies de aves que apresentaram resultado positivo para influenza A, habitat e distribuições geográficas	94

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição

Os vírus da Influenza aviária (AIV – do inglês – *Avian Influenza Virus*) apresentam alta morbidade e mortalidade na população de galinhas, perus, gansos, patos e outros. Os vírus de Influenza (VI) considerados patogênicos são raramente isolados de aves silvestres (ALEXANDER, 2000, 2003; HORIMOTO; KAWAOKA, 2001). Desde a última epidemia ocorrida em 1997 pela introdução da cepa A/chicken/HongKong/258/97 (H5N1), vírus emergentes vêm ocasionando morte e dizimação de milhões de aves, afetando sobremaneira em perda econômica nos países asiáticos e Eurásia (TRAMPUZ et al., 2004). Havendo inclusive casos fatais humanos em várias regiões do mundo (KHANNA et al., 2008; YASSINE; LEE; SAIF, 2011). As aves silvestres são assinaladas como terem contribuído na emergência do vírus gripe A (H1N1) responsável pela pandemia de 2009 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2013).

1.2 Classificação do vírus da Influenza

O vírus da Influenza aviária pertence à Família Ortomixoviridae, Gênero Influenzavírus do tipo A (ICTV- Internacional Comittee on Taxonomy of Viruse, 2012).

O vírus da Influenza se divide em três tipos A, B e C e o estudos dos isolado pelo método de sequenciamento e análise filogenética dos vírus da Influenza apresentaram evidências de que os três tipos tenham se originado de um ancestral comum, um vírus aviário (SHOLTISSEK, 1994; WEBSTER et al., 1992; WEBSTER 1997; WEBBY; WEBSTER, 2003).

O vírus da Influenza do tipo A apresenta alta variabilidade e capacidade de infectar populações susceptíveis, resultando em epidemias e pandemias. Isto se deve à particularidade do vírus de modificar sua estrutura antigênica permitindo sua circulação em populações variadas, ao exemplo temos os humanos, animais domésticos até aves (ALEXANDER, 2000, 2003; WEBSTER, 1997).

Os vírus da Influenza do tipo A são divididos em subtipos e variantes e atualmente existem dezessete subtipos de Hemaglutininas (HA) e nove subtipos de

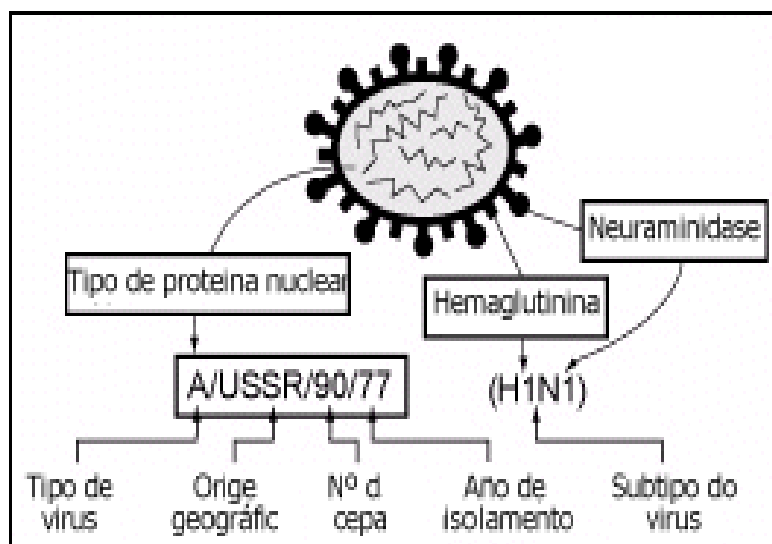
Neuraminidases (NA) isolados e mantidos na população de aves aquáticas, silvestres e morcegos. Dentre estes, com base nos estudos de sorologia e isolamento desde o ano de 1933, somente os vírus dos subtipos H1, H2 e H3 são mantidos na população humana (ALEXANDER, 2000, 2003; HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SUBBARAO; KATZ, 2000; WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

1.3 Nomenclatura do vírus da Influenza

A nomenclatura dos Vírus da Influenza A, adotada pela Organização Mundial de Saúde em 1971 (WHO, do Inglês – World Health Organization), empregada pelo VI Comitê Internacional de Nomenclatura realizado em 1980, para caracterizar os vírus isolados de Humanos e Animais. (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

A designação de cada amostra inclui o tipo espécie do hospedeiro (quando diferente da humana), local de origem, número amostra, ano de isolamento e antígenos de superfície como: A/turkey/Ontario/6118/68(H8N4). Por convenção, não se inclui hospedeiro de origem humana (fig. 1).

Figura 1- Normas para nomenclatura do Vírus da Influenza, segundo o ICTV.



Nota: A figura demonstra um exemplo de nomenclatura do Vírus Influenza humana A/USSR/90/77 de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV, do inglês- *International committee on taxonomy of viruses*)

Fonte: Adaptado de Lima et al., 2000.

1.4 Histórico

A primeira descrição de uma doença de aves relacionada a vírus, como sendo Influenza Aviária foi feita na Itália, no século passado quando foi comunicado um surto de peste aviária por Pierron citado em 1878 (STUBBS, 1965). Desde o início do século XX há comprovação de que a Peste aviária era causada por um vírus “filtrável” ocasionando alta mortalidade em galinhas, perus e outras espécies aviárias de acordo com Certanni e Savonuzii em 1900 (*apud* SALCEDO, 1980). Vírus associados á Peste Aviária inclusive em diversas espécies de aves e mamíferos foram citados por vários autores.

Estudos relacionados com a natureza de ribonucleoproteína (RNP) demonstraram que o vírus da peste Aviária e também o Vírus "N", tratavam-se na realidade de Influenza tipo A (ROTT; SCHAFER, 1960). Um agente hemaglutinante, que determinava alterações no sistema nervoso de patos, foi isolado em Manitoba, identificado como influenza "A/duck/Canadá/52" (MITCHELL; GUERIN; ROBILLARD, 1964). Dois vírus de Influenza A foram isolados em patos 4 anos depois, um na Inglaterra e outro na Tchecoslováquia (ROBERT, 1964). Perreira et al. (1965) demonstrou o isolamento do vírus “A/chicken/Scotland/59 (H5N2)” oriundo de galinha o qual demonstrou ser antigenicamente relacionado com o vírus “A/tern/SouthAfrica/61” obtido na África do Sul 2 anos depois (BECKER, 1966; ROWAN, 1962).

Durante o período de 1960 a 1970, foram caracterizadas mais de meia centena de vírus envolvendo perus, galinhas, patos, codornas, faisões e perdizes. A partir de 1971 foi incrementada a pesquisa do vírus em aves selvagens resultando em uma alta taxa de isolamentos (EASTERDAY; TUMOVÁ, 1978) ao exemplo em 1972, na Austrália, um vírus encontrado em pássaros marinhos foi chamado "A/shearwater/Australia/1/72" (DOWNIE; LAVER, 1973).

Yamane et al. (1979) estudando 26 isolados de amostras traqueal de patos entre os anos de 1976 a 1978, revelou a presença de 7 diferentes tipos de Hemaglutinina (HA1-7) e 5 diferentes tipos de Neuraminidases (NA1-5) nas mais variadas combinações e que a circulação dos subtipos, alternaram durante os anos sugerindo que os Influenza A (IA) coexistem ao mesmo tempo no Japão, mas as configurações antigênicas destes isolados mudaram a cada ano. Trabalhos atuais sugerem que o IA continua a se comportar como os achados de Yamane et al. (1979).

Os vírus de Influenza considerados patogênicos são raramente isolados de aves silvestres e esses dados são confirmados quando 17 epidemias no Mundo são descritas, sendo que oito aconteceram nas últimas décadas, porém 5 delas ocorreram em perus e 12 em galinhas, ambas aves domésticas (ALEXANDER, 2000, 2003; HORIMOTO; KAWAOKA, 2001).

Estudos sobre a epidemia de Influenza Aviária no período de 2002 e 2005, incluindo três focos de gripe aviária de alta patogenicidade ocorreram nas Américas: no Chile (H7N3) em 2002, nos Estados Unidos (H5N2) e no Canadá (H7N3) em 2004. O surto no Chile limitou-se a um criador de frangos de corte, porém representou o primeiro foco de HPAI (do inglês- *Highly pathogenic avian influenza virus*) nesse país. Tratava-se de um vírus de um HPAI distinto de todos os anteriormente encontrados e representava um clado na árvore filogenética diferente do clado da América do Sul (SUAREZ et al., 2004)

Nos Estados Unidos, o surto de HPAI (H5N2) aconteceu no Texas e se restringiu às galinhas dos mercados de aves e os sintomas clínicos foram equivalentes a uma cepa de baixa patogenicidade, entretanto devido uma mutação no sítio de clivagem a cepa tornou-se de alta patogenicidade. O maior foco de HPAI nos Estados Unidos ocorreu em 2002, quando 197 fazendas foram despovoadas e 4,7 milhões de aves exterminadas, para controlar um surto na Virgínia e estados vizinhos. O surto foi causado por um vírus HPAI-H7N2 intimamente relacionado com um vírus H7N2, que tem circulado no sistema de comercialização de pássaro no nordeste dos Estados Unidos desde 1994.

O surto no Canadá foi o maior das três epidemias envolvendo 42 instalações e aproximadamente 17 milhões de aves no Vale Fraser na Columbia Britânica. Nos três Países, os focos de HPAI foram erradicados com o extermínio das populações infectadas. Todos os outros relatos de infecções em aves residentes e aves selvagens pertenciam ao vírus da Influenza de baixa patogenicidade (LPAI, do inglês- *Low pathogenicity Avian Influenza virus*) (SENNE, 2007).

1.5 Estudo de Influenza A em aves no Brasil

Os vírus influenza A em todo o mundo ocorrem em aves selvagens e são associados a surtos em galinhas e perus comerciais. No entanto, não há incidência de AIV nas aves comerciais no Brasil. Os trabalhos descrevem avaliações de fauna

local, com amostragem de espécies selvagem (residentes e domésticas) de migração nacional e intercontinental (ARANKU; FARIA; TAKEYAMA, 1971; ARANKU et al., 1976; RESENDE et al., 1990; SALCEDO, 1980).

No Brasil, na cidade de Rio de Janeiro, Salcedo (1980) relata o primeiro isolamento do vírus da Influenza A que detectou em fezes coletada de patos silvestres (*Dendrocygna viaduta*) e de aves ornamentais, que possuíam afinidade antigênica com as amostras A/turkey/Massachusset/65 (H6N2) e A/duck/England/63 (H1N4).

No Estado de São Paulo foi realizado estudo sorológico em aves silvestres, residentes e migratórias que apresentaram anticorpos com afinidade antigênica A/duck/Czechoslovakia/56 (H4N6) (ARANKU et al., 1971).

Resende et al. (1990) citou que em avaliações sorológicas de plantéis industriais conduzidas em Minas Gerais, em frangos de corte não foram encontrados anticorpos para vírus da influenza A.

Kawamoto et al. (2005) registraram a presença de vírus da Influenza A em aves silvestres residentes e migratórias no ano de 1999. Neste estudo foram isoladas 14 amostras positivas de Influenza A de aves das espécies *Elaenia mesoleuca* (2), *Sporophila lineola* (1), *Sporophila caerulescens* (1), *Columbina talpacoti* (2), *Vireo olivaceus* (2), *Paroaria dominicana* (2), em dois tipos de coleta (oral e cloacal).

Mancini et al. (2003), analisaram padrão de hemaglutinação da Influenza A, oriundo de vários animais, como equinos, suínos, aves e humanos. As amostras de vírus de Influenza isoladas de aves demonstraram propriedades aglutinantes com hemácias de quase todas as espécies de animais, exceto com hemácia de bovino. O resultado indicou que os vírus de aves reconhecem a sequência SA α 2,3 Gal; SA α 2,6 Gal oligossacarídeo da superfície de eritrócitos de todas as espécies de animais citados.

Araujo (2004a), comunicou um inquérito epidemiológico realizada em município de Galinha localizada em Rio Grande do Norte. Nesse estudo foram coletados 388 amostras de 11 espécies de aves silvestres, no período de 22 de abril a 3 de maio de 2003. As amostras de fezes (pool) foram separadas em lotes, das quais foram isoladas de 13 lotes os subtipos H3 nas espécies de aves marinhas, sendo encontrado principalmente nas espécies *Calidris pusilla*, *Columbina sp.*, *P. squatorola*, *C. semipalmatus*, *Calidris fuscicollis*, *Arenaria interpres*, nas quais todas

são aves migratórias. Sendo que a espécie *Calidris fuscicollis* é oriundo dos Estados Unidos.

No ano de 2004 foi realizado inquérito epidemiológico no Parque Nacional da Lagoa do Peixe localizado no Rio Grande do Sul. Neste estudo foram capturadas 191 aves de espécies diferentes, dentre elas a espécie *Sterna hirundo* recuperadas com anilhas dos EUA e uma ave da espécie *Sterna eurygnata* recuperada com anilhas do CEMAVE/BRASIL e neste trabalho foram identificados os subtipos H2 e H4 (ARAUJO, 2004b).

Golono (2009) utilizando PCR tradicional e em tempo real, após transcriptase reversa (RT) detectou uma amostra positiva em Trinta Réis Boreal (*Sterna hirundo*) capturadas na Ilha de Canelas, região norte do Estado do Pará.

Ferreira (2010) em seu trabalho de Influenza Aviária com aves silvestres brasileiras capturou 38 passeriformes, 27 anseriformes e 33 perus, no ano de 2005. Em 2006, foram 595 anatídeos, 101 galiformes, 1 gaivota, 1 garça e 1 maguari. As aves foram provenientes dos Estados de Roraima (Monte Negro) e Pará (Baixa Grande/Matupiri, Breves e São Sebastião da Boa Vista na Ilha de Marajó, Castanhal/Terra Alta, São Caetano de Odivelas, Vigia/Marabitaná). Para definir o perfil sorológico dos 922 amostras foi realizado o teste de Inibição de Hemaglutinação (HI), porém não foi constatada a ocorrência de anticorpos para o vírus da Influenza A.

1.6 O AIV patogênico para o homem

Os AIV dos subtipos H3, H5, H7 e H9, antes denominadas patogênicas para as aves, estão infectando populações humanas suscetíveis, sem passar pelos hospedeiros intermediários suínos. Os subtipos H5N1, H9N2 e H3N2 se espalharam e evoluíram de formas diferentes nos hospedeiros infectados (DUCATEZ; WEBSTER; WEBBY, 2008).

O subtipo do vírus da Influenza aviária A/Chicken/Scotland/59 (H5N1) é altamente patogênico quando confinado à população de galinha. O vírus do mesmo subtipo A/Chicken/HongKong/97 (H5N1), em 1997, apresentou alta virulência e além de devastar a população de aves, foi responsável por infecções humanas na China com oito casos fatais (CLAAS et al., 1998; SUBARRO et al., 1998; SUBARRO; KATZ, 2000; WEBBY; WEBSTER, 2003).

Nos últimos anos, a incidência do vírus da Influenza aviária H5N1 tem aumentado e casos estão sendo identificados em vários países da Ásia, seguindo o trajeto de epidemias em aves além de outras espécies de animais. Os números de casos estão aumentando em vários outros países da Europa (Bélgica, Alemanha) e das Américas do Norte e Central (México) ameaçando a saúde da humanidade (CAPUA; ALEXANDER, 2002; CAPUA et al., 2003; LAI; PHILLIPS, 1999; PEIRIS et al., 2004; SPACKMAN et al., 2003; TRAMPUZ et al., 2004).

A amostra A/England/268/96 (H7N7) isolada pela primeira vez em humanos com quadro de conjuntivite, apresentou pela análise filogenética e sequenciamento parcial, dos sete segmentos do vírus. Em 1995, esta mesma amostra mostrou, homologia com o vírus H7N7 isolado de perus na Irlanda (BANKS; SPEIDEL; ALEXANDER, 1998; KURTZ; MANVELL; BANKS, 1996).

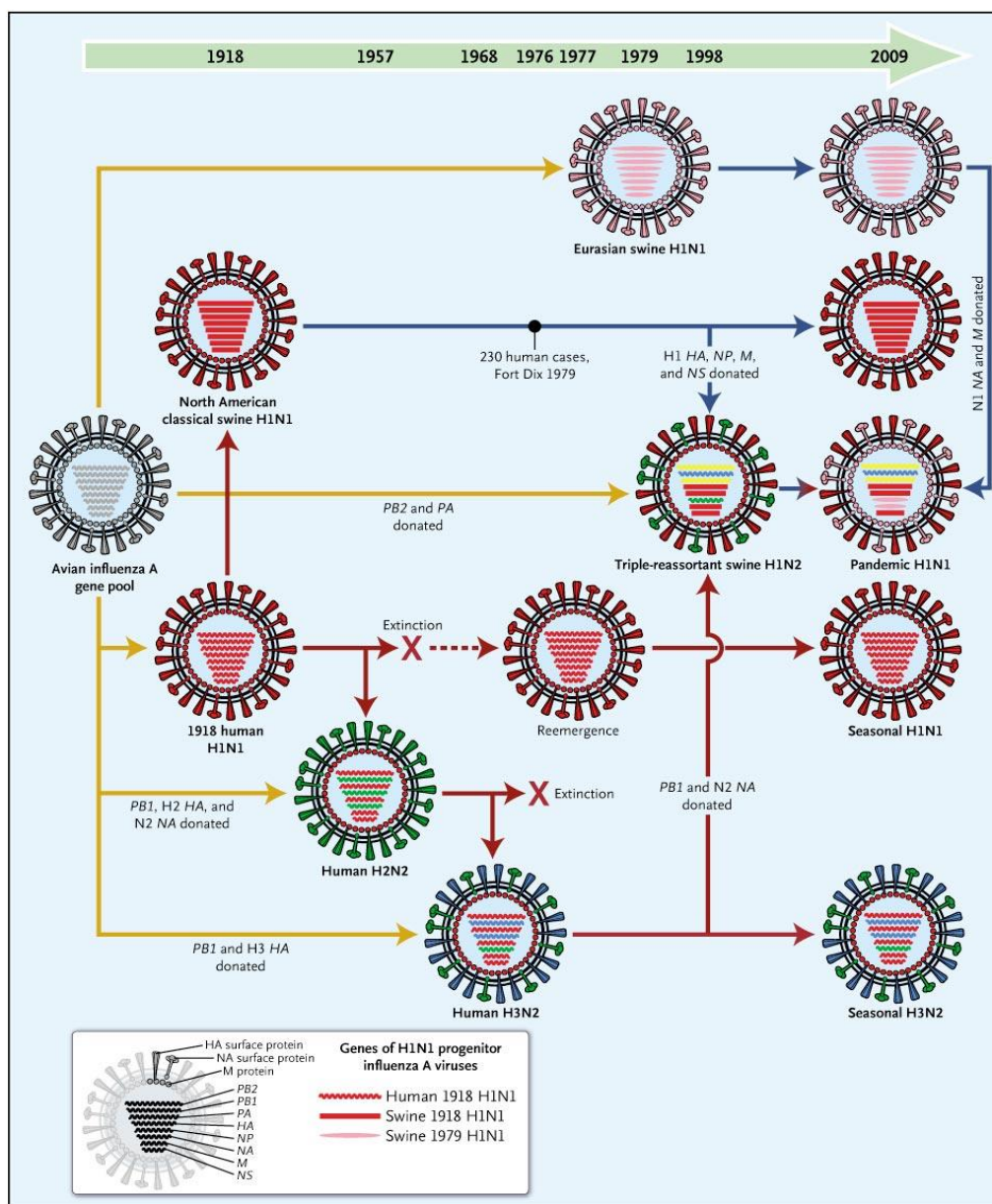
No ano de 1999, foi isolado pela primeira vez o vírus de influenza subtipo A/Chicken/HongKong/G9/97 (H9N2) das amostras oriundas de aspirado da nasofaringe de duas crianças hospitalizadas com febre e infecções nos tratos respiratórios inferiores em Hong Kong, China (KOOPMANS et al., 2004; LIN et al., 2000; SUBBARAO; KATZ, 2000). No Paquistão, no mesmo ano, durante epidemia em galinhas detectou-se o vírus A/Chicken/Pakistan/2/99 (H9N2) em humanos. Os dois subtipos de vírus de Influenza citados a cima, possuem seis genes internos idênticos aos do subtipo H5N1, o qual foi identificado em 1997 (CAMERON et al., 2000; LIN et al., 2000).

Posteriormente, nos anos 2003 e 2004, o vírus da Influenza ressurgiu transmitido do pato selvagem para galinhas domésticas. O vírus A/Chicken/Netherlands/1/03 (H7N7) cujo fenótipo é altamente virulento, provocou morbidade e mortalidade tanto na população de galinhas como na de patos. As pessoas expostas à população de aves doentes que foram infectadas apresentaram conjuntivite, sintomas de gripe e acometimento do quadro respiratório. O vírus A/Netherlands/3/03 (H7N7) foi isolado de um caso fatal que demonstrou possuir identidade do subtipo isolado de galinha. Os dois subtipos A contêm na região de clivagem, um composto de protease de base múltiplo de aminoácidos na glicoproteína da hemaglutinina viral. O exame do segmento do genoma do vírus isolado do humano que ocasionou em morte apresentou substituição de 26 nucleotídeos e os outros isolados, de 14 nucleotídeos (FOUCHIER et al., 2004; KOOPMANS et al., 2004).

O subtipo H9N2 disseminado na população de galinhas e gansos na Ásia demonstrou ser de baixa morbidade em humanos. Isso porque, foram constatadas mutações nas glicoproteínas da superfície viral de forma que as sequências se tornassem idênticas às dos subtipos dos vírus H2N2 humanos. Tais achados reforçam a necessidade de monitoramento constante dessas amostras que, por causar uma zoonose, poderão ser introduzidas na população humana susceptível originando uma epidemia (CAMERON et al., 2000; MATROSOVICH et al., 1999).

A amostra Gull/Maryland/704/77 (H13N6) de origem de ave marinha foi isolada de um caso fatal de uma paciente em Winsconsin-EUA com quadro respiratório agudo (WEBSTER et al., 1997). No ano de 2009, uma nova cepa patogênica denominada H1N1 suína clássica com três recombinações, oriunda dos subtipos H1N1 de aves e de H3N2 de seres humanos foi responsável pela epidemia no México, culminando como pandemia mundial com vários óbitos nas populações suscetíveis (Fig. 2). E até os dias atuais está sendo monitorada pela OMS (SMITH et al., 2009; WHO, 2013).

Figura 2- A figura demonstra a relação genética entre o vírus da Influenza suína, Aviários e humanos que contribuíram para o Flu A/H1N1 pandêmico de 2009.



Nota: As setas amarelas refletem a exportação de um ou mais genes da influenza aviária tipo A. A seta vermelha pontilhada indica um período sem a circulação do vírus. Setas vermelhas sólidas indicam os caminhos evolutivos das linhagens do vírus da Influenza humana. setas azuis sólidas, indicam a linhagem de vírus da Influenza suína. e a seta azul com vermelho, indicam um vírus da gripe humana de origem suína. Todos os vírus Influenza A contém oito genes que codificam as seguintes proteínas (mostrados de cima para baixo dentro de cada vírus): PB2 polimerase, PB1 polimerase, PA polimerase, hemaglutinina (HA), Nucleoproteína (NP), Neuraminidase (NA), as proteínas da matriz (M) e as proteínas não estruturais (NS). Os genes do vírus da Influenza de 1918 (H1N1) humana e suína e 1979 H1N1 Influenza virus A, foram todos descendentes dos genes do vírus da Influenza aviária tipo A, e alguns destes genes foram "dados" para a cepa H1N1 pandemia humana.

Fonte: Morens, 2009

Vários estudos estão confirmando a circulação de Influenza A/H3N2 nas populações de aves domésticas. É sabido que este subtipo é capaz de infectar humano e com o surgimento do tipo H3N2 com incorporação de um gene do vírus H5N1 levantaram-se novas preocupações sobre o surgimento de novos vírus que possam infectar e se adaptar em humanos e hospedeiros intermediários como os suínos e outros (CHEN et al., 2008; GUAN et al., 2010; ZHOU et al., 2011a).

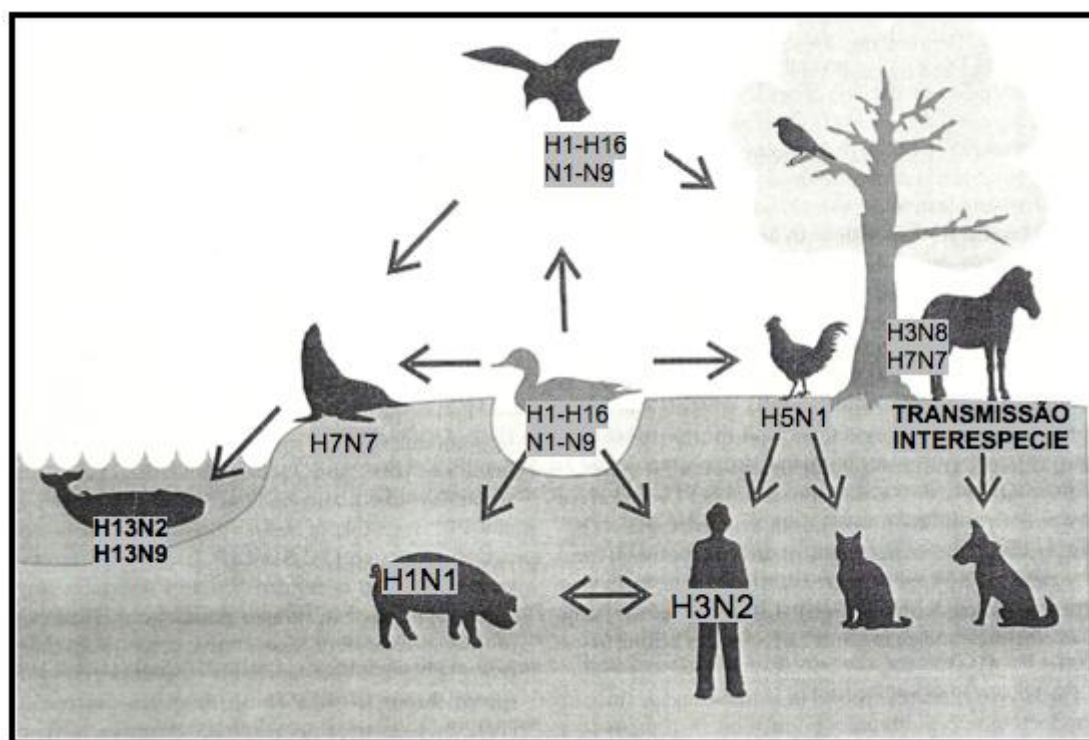
Na China três vírus foram isolados de cloaca de patos A/pato/HuBei/06/2009 (H3N2), A/pato/HuBei/09/2009 (H3N2) e A/pato/HuBei/10/2009 (H3N2). As análises filogenéticas revelaram que a sequência de nucleotídeos dos segmentos destes três isolados tinha a identidade do vírus subtipo H3N2 de suíno isolado no sul da China. No entanto, para proteína M as três cepas e uma cepa suína H1N1 isolada da América do Sul formaram um cluster. Para o segmento PB2 dois destes isolados formaram o cluster com vírus H5N1 isolado de patos infectados, demonstrando que este vírus emergente resultou da recombinação de H3N2 de patos com a cepa suína H1N1 e a AIV H5N1. O surgimento deste vírus H3N2 com incorporação de um gene do vírus H5N1 levanta novas preocupações sobre emergência de um novo vírus pandêmico (ZHOU et al., 2011b).

A organização Mundial de Saúde (OMS) relatou no dia primeiro de Abril de 2013, pela primeira vez, três casos de infecção humana e alguns casos fatais suscitados por um novo AIV (H7N9) na China (WHO, 2013).

1.7 Reservatório de Influenza A

Várias evidências confirmam que aves aquáticas e silvestres são reservatórios de todos os subtipos de Influenza A (IA), devido a recombinações entre os subtipos de Hemaglutininas e Neuraminidase e as quais surgem através de infecções inter espécies na natureza. Durante séculos, os IA nesses reservatórios foram se perpetuando e disseminando mutantes e/ou recombinantes capazes de infectar as diversas espécies animais, incluindo focas, baleias, suínos, cavalos aves domésticos e humanos (MURPHY; WEBSTER, 1996). A figura 3 mostra o intercâmbio, representado pelas setas, de IA entre diferentes espécies.

Figura 3- Representação dos hospedeiros do vírus Influenza A e suas transmissões inter e intra espécies.



Nota: As aves selvagens aquáticas são reservatórios de todos os subtipos de Influenza A. As setas indicam a transmissão de aves aquáticas selvagens para aves domésticas, mamíferos marinhos, baleias, equinos, suínos e seres humanos, além de demonstrar a transmissão de suínos para humanos e de aves para seres humanos. Recentemente há transmissão de equino para cães e gatos.

Fonte: Modificado de Wright, Neumann e Kawaoka (2007).

O vírus do subtipo A/Eq1/Prague/ 1/ 56 (H7N7) foi isolado numa pandemia de doença respiratória entre os equinos na Europa e surto na Índia e Egito. Acredita-se que o vírus continue circulando na população de equinos de forma subclínica. (WEBSTER, 1993).

O vírus do subtipo A/Equine 2/Miami/1/63 (H3N8) foi isolado durante uma grande epidemia ocorrida nos Estados Unidos, em 1989. O vírus apresentou morbidade de 80% e mortalidade de 20% na população equina. As análises das sequências desse vírus determinaram a origem em aves e se estabeleceu na população de equinos (WEBSTER; GUO, 1991). Em 2004, ocorreu na Florida-EUA a transmissão do vírus A/Equine2/Miami/1/63 (H3N8) de equino para cães, onde o cão infectado pelo vírus A/Canine/Florida/43/04 (H3N8) apresentou graves sinais clínicos com transmissão para outras populações caninas nos Estados Unidos (CRAWFORD; DUBOVI; CASTLEMAN, 2005) e a análise filogenética demonstrou

que mudanças moleculares na HA da cepa de equino permitiu a adaptação evolutiva para o novo hospedeiro.

Uma epidemia em focas ocorrida entre 1979 e 1980 infectou 20% da população da espécie (*Phoca vitolina*). Esses animais morreram em consequência de pneumonia respiratória, na costa dos Estados Unidos. A análise genética revelou que A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7), procedeu de origem aviária. Em 1982 a 1983 espécie de *Phoca* cárpica foi infectada pelos vírus de Influenza dos subtipo H4N5, H3N2, H4N6, aviária comprovada pelo isolamento e sorologia e com resposta antigênica para H3N2 humano (CALLAN et al., 1995).

Baleias foram infectadas pelos subtipos H13N2 e H13N9 atestados pelo isolamento dos vírus dos pulmões desses mamíferos (HINSHAW et al., 1986). Os gatos domésticos e tigre do Zoológico morreram após ingerirem da carne de frango infectadas com vírus do subtipo H5N1 aviário após adquirir a doença (SPRENGER et al., 1993).

Na Suécia o vírus da Influenza A do subtipo H10N4 aviário, foi introduzido na população de *vison* (mamíferos mustelídeos) expondo à mortalidade e transmissão entre os animais. A infecção experimental comprovou a sua suscetibilidade de replicação dos vírus de origem de aves, equinos, suínos e humanos com capacidade de transmissão aos animais desafiados (KLINGEBORN et al., 1985; OZAKI et al., 1983).

Yasuda et al. (1991) pela análise molecular observou a transmissão do Influenza A subtipo H3 do pato silvestre para pato doméstico e suínos, ocorrido no sul da China.

Um novo vírus Influenza-like (H17N10) foi recentemente descoberto em morcegos. A glicoproteína do envelope viral da hemaglutinina (HA) revelou que H17 não apresenta $\alpha 2, 6$ receptor siálico (SA) humano e $\alpha 2, 3$ receptor siálico (SA) aviária e são de baixa estabilidade térmica (SUN et al., 2013).

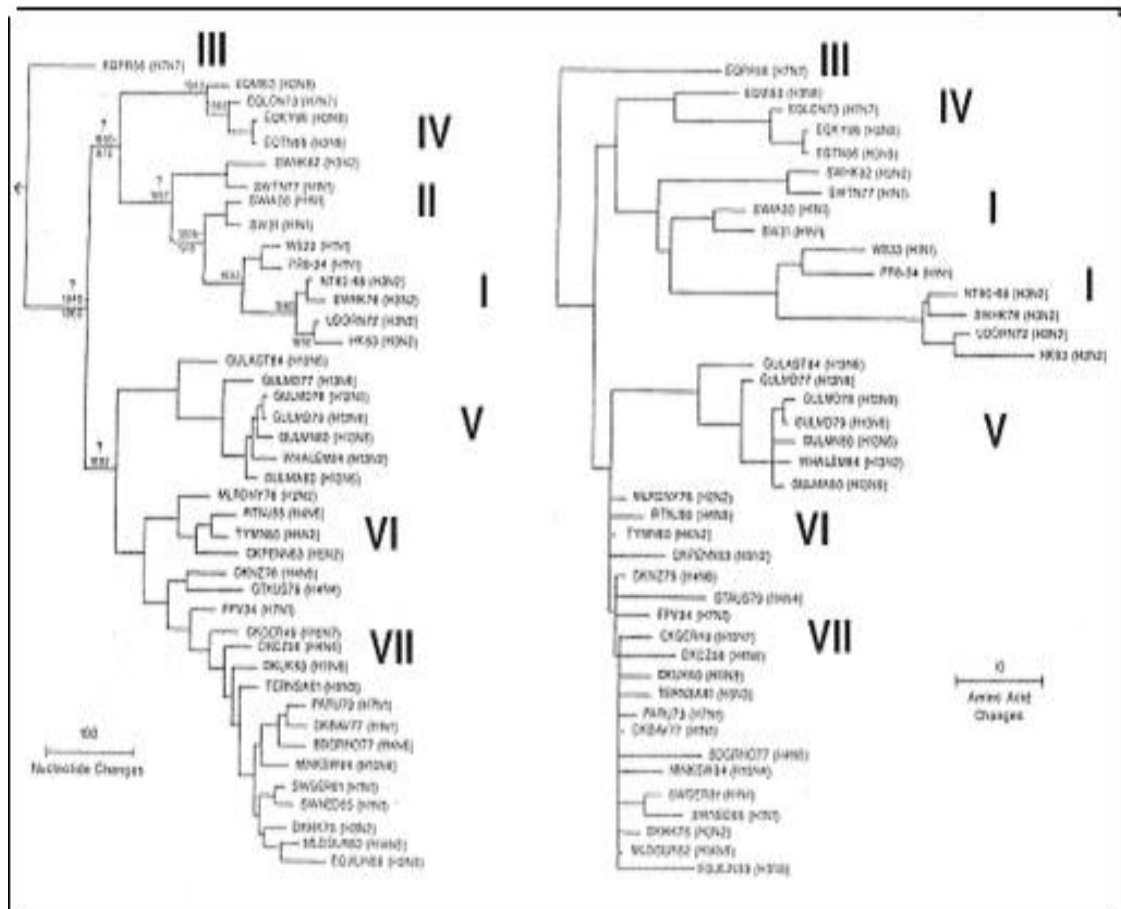
1.8 Evolução do vírus da Influenza

A partir das análises filogenéticas do gene NP do vírus da Influenza A de vários hospedeiros concluí-se que existem sete linhagens de vírus da Influenza A: dois equinos vírus A/Eq1/SP/1/56(H7N7) e A/Eq2/SP/1/85(H3N8); um em ganso da

América do Norte; uma em aves Eurásia além de um vírus de suíno “avian like”; um suíno e um humano. Os dois últimos pertencem ao grupo filogenético como derivado de vírus aviário (GORMAN et al., 1991; HORIMOTO et al., 2001).

Estudos dos segmentos do gene do vírus das espécies aviários divergem em duas sublinhagens distintas de acordo com divisão geográfica Eurásia e Americanas (DONIS et al., 1989). Para estirpes das Américas e Europa/Ásia segundo Webster et al. (1992), a distinção estaria associada à migração de aves aquáticas, principalmente no sentido norte-sul (latitude) nesses continentes, e não leste-oeste (longitude). Aves que migram no sentido da longitude teriam importante papel na continuidade da evolução de influenza. Fator indicativo de que as aves migratórias participam ativamente da transmissão de Influenza aviária entre dois continentes.

Figura 4- Árvore filogenética do vírus da influenza A, gene da NP.



Nota: A árvore da esquerda foi baseada no alinhamento de seqüências de nucleotídeos, enquanto que a da direita foi baseada no alinhamento de seqüência de aminoácidos. As árvores demonstram as sete linhagens de hospedeiros específicos: (I) humano; (II) suíno clássico; (III) H7N7 equino

(A/equine/Prague/56); (IV) recente equino; (V) H13 gull; (VI) aves da América do Norte; (VII) vírus das aves Eurásia.

Fonte: Wright, Neumann e Kawaoka (2007).

Entre os grupos de suínos e humanos, a taxa de evolução na proteína da HA é alta, no entanto as proteínas internas (RNA transcriptases NP, M1 e NS) apresentam uma baixa taxa de evolução, apresentando mutações silenciosas. Estas evoluções foram detectadas durante o período de 55 anos (ITO et al., 1991). Para os vírus do AIV de aves aquáticas, os índices de evolução foram baixa, indicando de que as taxa de mutações não ocorreram nos últimos 60 anos. As mudanças de nucleotídeos nos vírus da Influenza de aves são silenciosas e não representam trocas de aminoácidos, significando que na população de aves aquáticas, causam infecções inaparentes, com quase nenhuma alteração nas glicoproteínas das Hemaglutinina e Neuraminidase mantendo como reservatório natural de todos os subtipos do vírus da influenza A (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001).

A pressão seletiva para adaptação nas espécies na classe dos mamíferos determina alta mutabilidade. As sequências de nucleotídeos dos genes precursores da Hemaglutinina (HA) e componentes não estruturais (NS) da AIV em surtos de galinhas e perus indicaram que as taxas de evolução foram semelhantes às de mamíferos, comprovando a adaptação de IA em tais espécies de aves (SUAREZ; SENNE; 2000).

As relações filogenéticas das AIV do subtipo H5 isoladas na América do Norte foram avaliadas por análise dos genes da HA e NS, indicando a manutenção de múltiplas divisões e sub-linhagens em aves aquáticas migratórias, sendo que, das quatro sequências de HA1 conhecidas, três estão presentes em aves aquáticas migratórias (MARAKOVA et al., 1998). A análise filogenética do gene NS do subtipo H5N1 em populações de patos evidenciou a existência de sub-linhagens múltiplas e rearranjo deste gene em dois alelos. Das sub-linhagens, as mais instáveis geneticamente foram àquelas isoladas dos surtos recentes no México central. As sequências de aminoácidos de HA da região associada com a adsorção ao receptor celular revelaram que isolados de aves aquáticas, galinhas vivas de mercado popular e perus não possuíam glicosilação no aminoácido 236 (GARCIA et al., 1997).

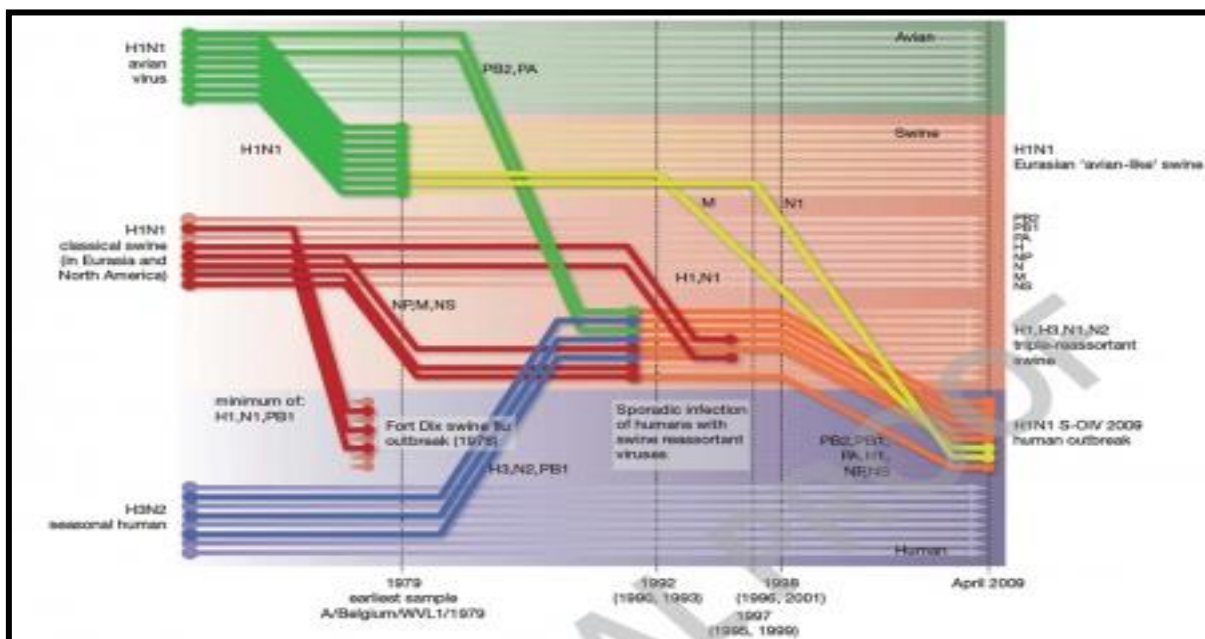
Análises evolutivas foram usadas pelas equipes de pesquisadores do Reino Unido, Hong Kong e Estados Unidos para reconstruir a origem do vírus da gripe suína (H1N1). Ao comparar as sequências do genoma da estirpe pandemia com

centenas de outras cepas de suínos, aves e humanos que representam o espectro completo de vírus da gripe, foram capazes de construir uma árvore genealógica de S-OIV (do inglês – Swine origin influenza vírus) e dados de seu surgimento. A análise mostra que S-OIV é derivado de vários vírus já em circulação em suínos, alguns dos quais foram de origem aviária ou humana. A transmissão inicial de S-OIV aos seres humanos ocorreu vários meses antes da epidemia. (SMITH et al., 2009).

As linhas do diagrama demonstrado na figura 5, representam as origens de cada 8 genes das três subtipos de vírus de Influenza A. O Vírus H1N1 (suína clássica) tem existido nessa espécie da América do Norte e Eurásia por pelo menos, 80 anos. “O diagrama mostra que durante os últimos 30 anos o vírus H1N1 de aves (linhas verdes) e o vírus H3N2 de seres humanos (linhas azuis) se misturam com os vírus suínos clássicos (linha rosa do diagrama) para criar um vírus de triple-recombinante”. As recombinações dos genes PB1 e NA foram oriundas das cepas H3N2 humana, PB2 e PA de vírus aviária e as proteínas HA, NP, M, NS de suínos domésticos da América do Norte (ZELL; SCHOLTISSEK; LUDWIG, 2009). Os últimos contribuíram como reservatórios e transmissores do vírus recombinante entre os animais da Eurásia e América do Norte auxiliando nesses eventos de rearranjo.

A figura 5 mostra as semelhanças com algumas estirpes recentemente sequenciadas da gripe de Hong Kong, e sugere que os vírus predecessores de S-OIV foram amplamente distribuídos por vários continentes. Os números de alterações entre a sequência e o sincronismo de rearranjos que levaram a estirpe a pandemia foram datados entre 9 e 17 anos atrás. Isso significa que os vírus triple-recombinantes estiveram presentes em suínos há cerca de uma década sem serem detectados durante esse tempo. A quantidade de diversidade de sequência dentro da estirpe pandemia nos seres humanos sugere que S-OIV vírus fez o salto para nossa espécie em torno de Janeiro de 2009. No entanto, os autores não foram capazes de identificar a origem imediata da estirpe pandemia, devido às grandes lacunas nos registros genéticos dos vírus da gripe suína em todo o mundo.

Figura 5- Evolução da cepa H1N1 endêmica (S-OIV).



Nota: Os oito pontos representam as 8 partes do genoma de S-OIV e as linhas representam as origens de cada subtipo. O vírus H1N1 de aves (linhas verdes) e os vírus H3N2 de seres humanos (linhas azuis) se misturam com os vírus suína clássica (linha rosa)

Fonte: Smith (2009).

Podemos citar várias evidências que reforçam os estudos do vírus S-OIVO, tais como o papel dos suínos como fonte de vírus para humanos e aves e vice-versa tem sido sempre relatado. O isolamento de AIV do subgrupo H4N6 de suínos com pneumonia de uma fazenda comercial, descrito no Canadá, permitiu a demonstração da infecção natural interespecie de aves para suínos. A análise filogenética dos 8 segmentos do RNA demonstrou ser essa estirpe representante da linhagem norte-americana de AIV (KARASIN et al., 2000).

Foram descritos segundo a análise dos genes da HA de quatro isolados de AIV suínos da Carolina do Norte, Texas, Minnesota e Iowa que todos foram derivados do isolado humano H3N2 que circulou em 1995 (ZHOU et al., 1999).

A sequência de nucleotídeos do gene da HA1 da estirpe *A/turkey/Germany/2482/90*, isolada de aves mantidas em fazenda de suínos, foi comparada com o gene da HA1 de estirpes isoladas dos surtos recentes de influenza em aves e suínos. As sequências do gene da HA de uma estirpe H1 de perus proporcionaram evidências de transmissão originária de suínos (WOOD et al., 1997). Por conseguinte, recombinações genéticas múltiplas foram demonstradas entre influenza aviária, influenza humana em coinfeções em suínos. Elas geraram

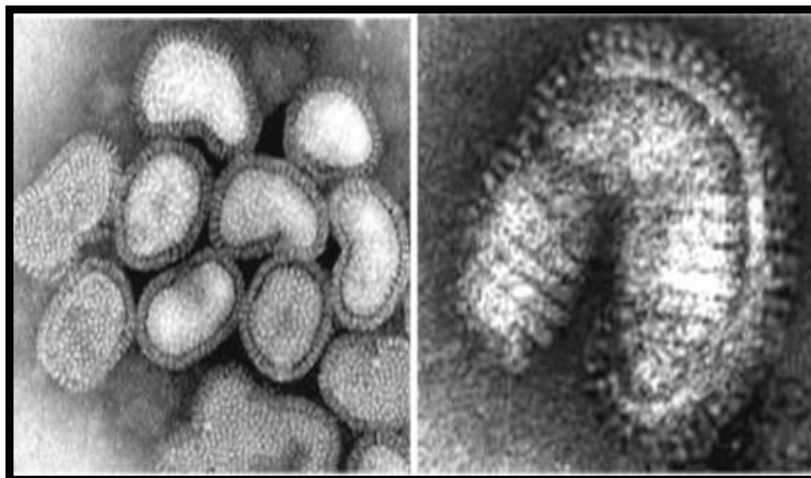
um novo genótipo de H1N2 a partir de coinfeção de H1N1 tipo humano e H3N2 tipo suíno seguido de infecção por H1N1 tipo aviário (BROWN et al., 1998).

A Pandemia de gripe tem trazido uma ameaça crescente para a saúde pública em todo o mundo na última década. No século XX, três focos de pandemia de gripe humana ocorreram em 1918, 1957 e 1968, causando expressiva mortalidade. Várias hipóteses têm sido propostas para o surgimento e o desenvolvimento de vírus pandêmico, incluindo a introdução direta em seres humanos de uma origem aviária e rearranjo entre aviária e humana que circularam em nossa espécie, ou através de um hospedeiro intermediário de mamíferos. No entanto, a história evolutiva dos vírus pandêmicos tem sido controversa, principalmente devido à falta de informação genética de antecedentes e rigorosas análises filogenéticas (TRAMPUZ et al., 2004).

1.9 Propriedades do Vírus da Influenza

Os vírus da Influenza apresentam formas esféricas alongadas e filamentosas que, por coloração negativa com fosfotungstato, podem ser observadas ao microscópio eletrônico, apresentando o diâmetro de 120 - 150 nm. Na superfície do vírus ocorrem projeções que medem 10-16 nm de comprimento e 4-6 nm de diâmetro. Há dois tipos de glicoproteínas denominadas de Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA). O envelope contém projeções de HA e NA, que formam um halo característico ao redor das partículas em coloração negativa e são verificadas por microscopia eletrônica de contrastação negativa (Fig. 6).

Figura 6- Microscopia eletrônica de contrastação negativa do Vírus da Influenza.

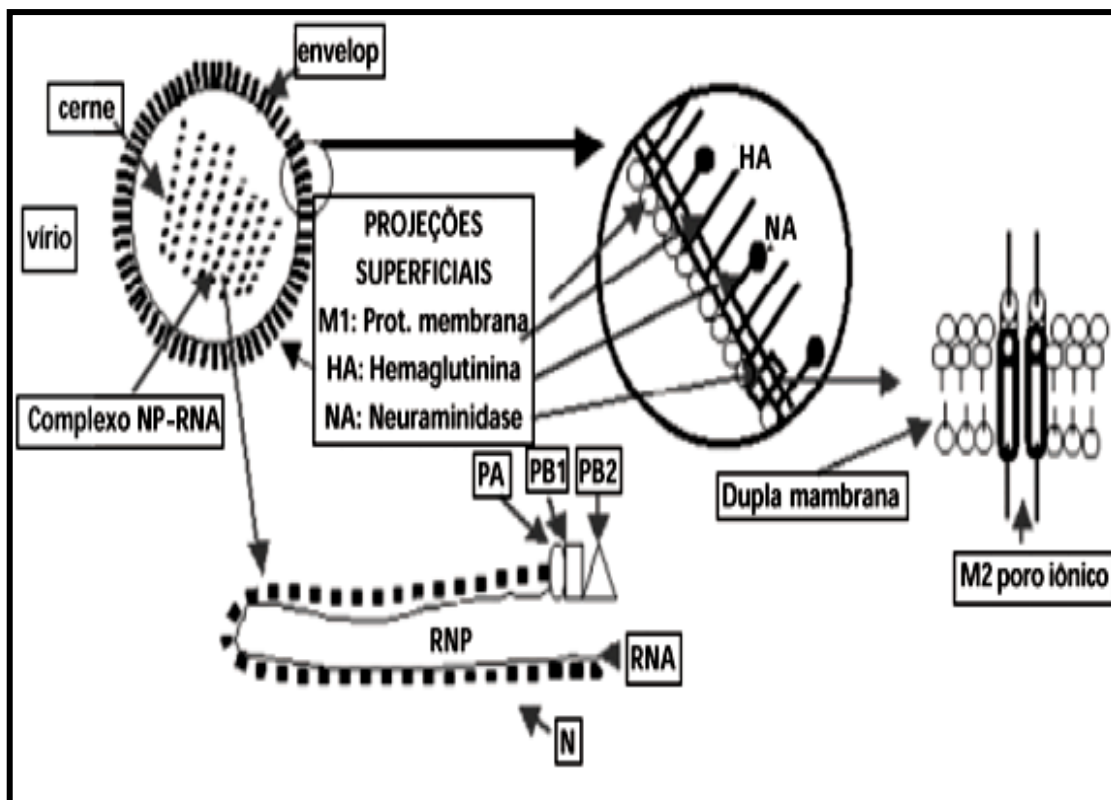


Fonte: Stannard, 1995.

1.10 Genoma do vírus da Influenza A

O tamanho do genoma do vírus da Influenza varia de acordo com seus tipos, subtipos e segmentos. Os vírus da Influenza A e B contêm oito segmentos, os quais codificam 11 proteínas estruturais e não estruturais (PALESE; SHAW, 2007; PORTELA; EDIGARD, 2002), enquanto a C possui sete segmentos, codificando 9 proteínas e ausência de gene neuraminidase (NEUMANN; HUGHES; KAWAOKA, 2000). O segmento da Influenza A é linear de fita de senso negativo ou complementar, os mRNA são constituídos de 8 segmentos de 900 a 2350 nucleotídeos. Esses compreendem os genes: NP e três subunidades de polimerase (PB1, PB2 e PA) que formam o complexo nucleoproteína (RNP) que participam na replicação e transcrição do RNA. Além das Proteínas superficiais Hemaglutinina, Neuraminidase, M1 e M2 e das não estruturais NS1-NS2 (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007) (Fig. 7).

Figura 7- Ilustração esquemática das estruturas de Orthomyxoviridae.



Fonte: Adaptada de Murphy e Webster (1996).

1.10.1 A proteína Polimerase Básica 2 (PB2)

Esta proteína é composta de 2341 nucleotídeos (PALESE; SHAW, 2007). A proteína PB2 participa na ligação do capsídeo nas moléculas pré mRNA (BLAAS; PATZELT; KUECHLER, 1982). A alteração de um aminoácido da proteína PB2 pela mutação do aminoácido na posição 627 do gene PB2 favoreceu na adaptação de vírus de origem aviária vírus do subtipos subtipos H7N7 e H5N1 para humanos e sua replicação em células de outros mamíferos (FOUCHIER et al., 2004; WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007; GUAN et al., 2010).

1.10.2 A proteína Polimerase Básica1 (PB1)

A proteína (PB1) é formada por 2341 nucleotídeos. Essa proteína tem duas funções na adição dos nucleotídeos durante o alongamento do RNA e a ligação nas extremidades terminais do RNA viral (RNA_v) e do RNA complementar (RNA_c)

para iniciar a transcrição e replicação (GONZALES; ORTIN, 1999). Outro peptídeo denominado Proteína Polimerase Básica 1 – F2 encontrados na maioria dos vírus Influenza é capaz de ocasionar alterações morfológicas e destruição da membrana mitocondrial da célula hospedeira, suscitando em morte celular (CHEN et al., 2001).

1.10.3 A proteína Polimerase Ácida (PA)

Esta proteína é formada por 2233 nucleotídeos. A proteína PA tem um papel importante no mecanismo de transcrição e replicação quando ocorrem algumas mutações virais (PALESE; SHAW, 2007).

1.10.4 A Nucleoproteína (NP)

É a maior entre as proteínas estruturais, constituído 1565 nucleotídeos. A NP em conjunto com a RNA-Polimerase/RNA-Dependente atuam na transcrição e replicação do genoma viral e pela diferença composição antigênica da proteína NP dos vírus da Influenza podem tipificar os três gêneros A, B e C (PALESE; SHAW, 2007).

1.10.5 Proteínas M1 E M2

As proteínas M1 possui 756 nucleotídeos e a proteína M2 de 291 nucleotídeos. Os genes dessas proteínas são codificados no mesmo sitio, porém sofrem pressões seletivas diferentes. Na proteína M1, 96% das mudanças são silenciosas e na proteína M2 apenas 66% são silenciosas (STOUFFER et al., 2008; WEBSTER et al., 1992).

A proteína M1 do envelope viral liga à proteína M2 e exerce a função de montagem e liberação dos vírus das células hospedeira.

A M2 é uma proteína transmembrana expressa em larga escala na superfície do vírus que facilita no transporte através das membranas celulares durante a replicação viral (SCHROEDER et al., 1994). Além disso, atua como regulador do pH na membrana do complexo de Golgi das células infectadas durante o processo de maturação viral (PIELAK et al., 2010).

1.10.6 As proteínas não estruturais (NS1 e NS2)

A proteína nuclear NS1 formada de 890 nucleotídeos é encontrada em células infectadas. Essa proteína desempenha diversas funções, como regulação no anelamento, é associada ao processo de tradução do mRNA para o núcleo da célula e interferência na atividade do interferon do hospedeiro (LAMB; KRUG, 2007).

A Proteína NS2 formada de 605 nucleotídeos é conhecida como NEP (do inglês - Nuclear Export Protein), é responsável pela translocação do RNA do núcleo para o citoplasma com interação da proteína M1 (RICHARDSOM; AKKINA, 1991; YASSUDA et al., 1993)

1.10.7 Hemaglutinina (HA)

É uma glicoproteína de superfície é constituída de 1742 a 1778 nucleotídeos, sintetizada no retículo endoplasmático como precursor H⁰. Após a tradução do precursor ocorrem a glicosilação com adição de ácidos graxos e a clivagem proteolítica, necessária para a função da molécula. De tal clivagem originaram-se duas cadeias de polipeptídeos denominadas HA1 e HA2. (HORIMOTO; KAWAOKA, 1994).

As cadeias HA1 e HA2 estão ligadas por pontes de dissulfeto. A porção amino terminal da proteína HA1 é encontrada na parte externa da membrana lipídica e a proteína HA2 fica ancorada na membrana lipídica. As hemaglutininas são responsáveis, pela adsorção dos vírus aos receptores específicos presentes em diferentes tipos de células: humanas, macacos, cobaias e equinos. Ainda é responsável pela penetração do vírus através da membrana citoplasmática, intermediando a fusão do envelope da partícula endocitada com a membrana endosomal, resultando na liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma. (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

As moléculas de Hemaglutinina (H⁰ e H2) estão ancoradas e projetadas no envelope na extremidade distal e conectado a HA₁ que é a subunidade globular mais externa formando um trimero. As estratégias para a fusão das duplas camadas lipídicas do envelope viral e célula hospedeira requerem trímeros de HA para adsorver e assegurar a formação do poro de fusão competente e sítio trans-

membrana para a completa fusão. HA1 ancora-se às membranas e promove fusão apenas parcial (hemifusão).

Uma região hidrofóbica de HA₂ torna-se exposta em pH ácido e forma a glicoproteína da fusão. As mudanças conformacionais na HA em pH baixo resultam na exposição de alguns sítios. Por exemplo, os sítios de clivagem por tripsina do peptídeo da fusão exposto tornam-se sensíveis à digestão pela termolisina e a ponte dissulfídica única a ligar HA₁ e HA₂ torna-se exposta. Apesar das modificações, a molécula mantém a estrutura trimérica e os sítios de combinação com o receptor mantêm os resíduos de ligação ao ácido siálico. As pontes dissulfídicas entre as subunidades HA₁ e HA₂ protegem a HA de mudança conformacional em pH ácido, a qual impediria a associação ao receptor celular (LAMB; KRUG, 2007).

A Hemaglutinina desenvolve formação de anticorpos neutralizantes em hospedeiros pós-infectados e apresenta atividade hemaglutinante.. (BARBOSA et al., 1997; COUCEIRO et al., 1994; HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; ITO et al., 1997).

1.10.8 A neuraminidase (NA)

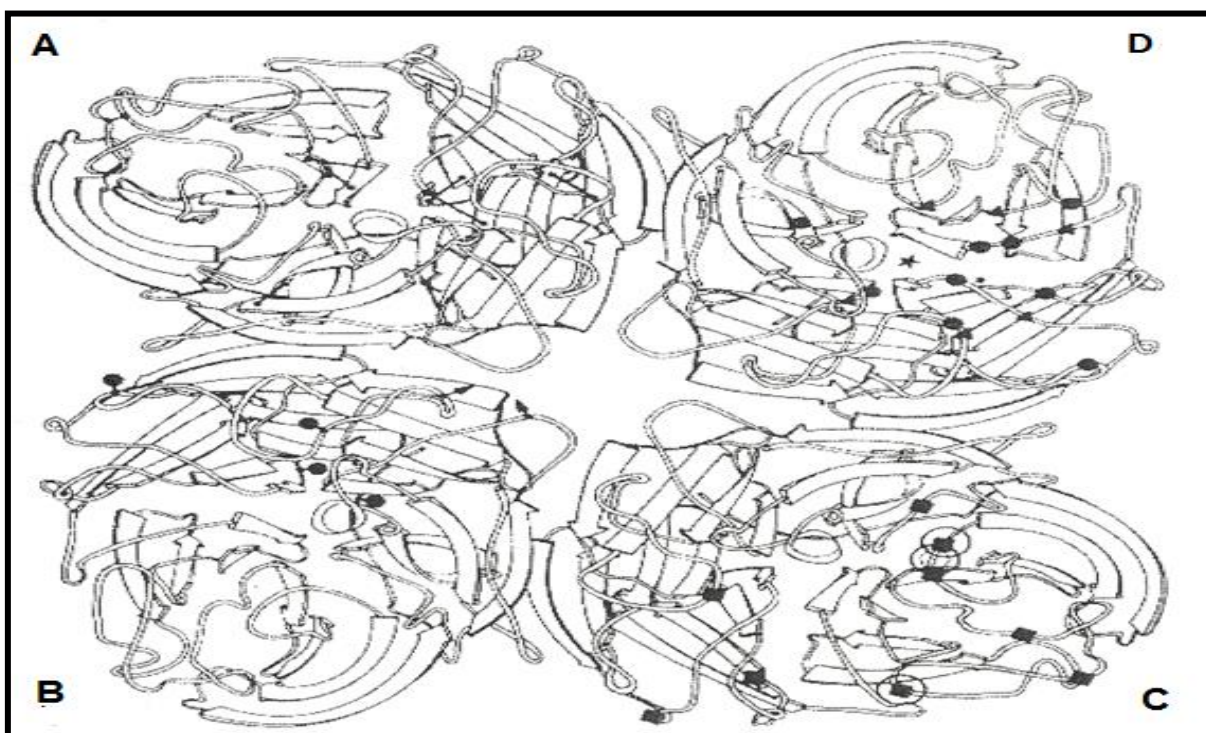
Esta glicoproteína é encontrada na superfície do vírus e juntamente com a HA tem importante função na liberação dos vírus do interior da célula, após a replicação viral. A estrutura da NA é formada de uma haste com uma porção globular (cabeça) na extremidade, tomando a forma de um cogumelo. A NA um tetrâmero proteína integrante da membrana do vírus pode ser removida do envelope viral com enzima protease, que pode ser observada em forma de rosetas apresentando atividade neuraminidase ativa. (LAVÉR; GARMAN, 2002).

A atividade enzimática da NA sobre os sítios de ácido siálico dos receptores celulares são mediada por dois sítios: um na superfície superior (distal) e outro na superfície inferior (proximal) da cabeça globular. Na extremidade globular, 11 sítios conservados apresentam ligação ao ácido siálico. Com a remoção desse ácido da HA pela NA da superfície celular facilita-se o transporte do vírus pela camada de mucina, o que permite ao vírus de encontrar o seu receptor na membrana celular das células da mucosa do hospedeiro infectado (LAMB; KRUG, 2007).

Webster e Laver (1980) definiram quatro regiões antigênicas diferentes no gene de Neuraminidase, sendo um sítio ativo conservada, das cepas de Influenza A e B, e os demais sítios, acarretam variações antigênicas ao longo dos anos.

O número de frequência de substituição de nucleotídeos para o gene inteiro é estimado em $2,28 \times 10^{-3}$ sítios por ano, com 42% de mutação silenciosa e 35% dessas substituições localizadas em regiões importantes dos epítopos da proteína (XU et al., 1996). O gene de NA apresentam atividade imunogênica (KILBOURNE et al., 2004).

Figura 8- Estrutura tridimensional da proteína Neuraminidase.



Nota: A- Ponte de dissulfeto; B- sítio de glicosilação do amino ácido na posição 86,1646, 200 e 2349 (círculo), nos sítios de Asparagina 113 e 114 (flexas). C-Resíduos que diferem a N2 (quadrado preto) e N9 (círculo preto), variantes selecionados com anticorpos monoclonais. D- Resíduos de ácido e básico conservada da Influenza A.

Fonte: Wright, Neumann e Kawaoka (2007).

1.11 Replicação viral

1.11.1 Adsorção

A replicação tem início com a adsorção da partícula viral à superfície da célula hospedeira. Para que haja a adsorção é essencial uma interação entre a HA do vírus e dos receptores na membrana da célula hospedeira. Também é necessário um pH ideal para fusão na membrana endossomal (BARBOSA et al., 1997; BULOUGH et al., 1994). O sítio de combinação entre a HA e o receptor celular é uma estrutura tridimensional, cuja interação com o ácido siálico é mediada nas estirpes de aves e equinos ligados preferencialmente ao receptor 2-3Gal (SA2-3Gal) do ácido siálico terminal, enquanto as estirpes humanas ligam-se ao receptor SA2-6Gal (LAMB; KRUG, 2007). As traqueias de suínos possuem receptores para vírus de aves (SA α 2-3Gal) e de humanos (SA α 2-6Gal). Os suínos por possuírem essa característica exercem o papel de hospedeiros para a recombinação de estirpes de aves e humanos (SUZUKI et al., 2000).

A clivagem da molécula HA⁰ em HA₁ e HA₂ é um pré-requisito para a mudança conformacional, que ocorre em pH ácido e, portanto, uma condição para infecciosidade. As HA que possuem resíduo único do aminoácido básico arginina no peptídeo de conexão entre HA₁ e HA₂ não são clivadas *in vitro*, ou seja, não são clivadas por maturação no complexo de Golgi, mas podem ser clivadas pela adição de tripsina exógena (KLENK et al., 1975). A patogenicidade dos AIV está relacionada à ativação dos novos vírions pela furina. As proteases de diversas células em cultivo *in vitro* foram comparadas com a furina purificada, confirmando o papel da última como ativadora da HA para fusão (WALKER; KAWAOKA, 1993). Além da ativação da HA pela furina há outras enzimas descritas com papel maturador da HA. A protease PC6, também relacionada a subtilisina e muito disseminada, pode também ativar AIV virulentos *in vitro*, indicando que outras enzimas de clivagem da HA podem estar presentes nos animais (HORIMOTO; KAWAOKA et al., 1994).

1.11.2 Penetração

A penetração dos vírus na célula ocorre por mecanismo de endocitose. A partícula viral, incorporada à célula hospedeira por pinocitose, se funde a um lisossoma. As enzimas lisossomal e a proteína M2 dissociam a proteína M1 do RNA (ribonucleoproteína) liberam para o citoplasma da célula e a transportam para o núcleo formando o complexo PB1 (NATH; NAYAK, 1990), PB2 (MUKAIGAWA; NAYAK, 1991) e NP (NEUMANN; CASTRICCI; KAWAOKA, 1997; WANG; PALESE; O'NEILL, 1997).

A endocitose envolve receptores de manose, os quais são considerados os principais receptores para os vírus da influenza vírus. (READING et al., 2000). Uma invaginação forma-se em sítios tipo bolsa, e após sua remoção a vesícula é fundida com endossomos formando uma série de organelas celulares. A seguir, promovem o desnudamento das partículas virais com a participação da proteína M2 como canal iônico essencial para o desnudamento do influenza vírus. O pH baixo do endossomo ativa o canal iônico de M2 e o fluxo de íons para o interior do vírion rompendo as interações proteína-proteína entre ribonucleoproteína (RNP) e M1. O pH neutro da membrana celular permite a associação RNP-M1 e montagem do vírion na saída da célula. O canal iônico mediado pela proteína M2 possibilita ao pH ácido no interior da partícula viral a fusão do envelope do vírion com a membrana da célula (LAMB; KRUG, 1996; MURPHY; WEBSTER, 1996). A introdução do RNA no núcleo celular ocorre através dos poros da membrana nuclear ainda como complexo RNP. O RNA viral (RNAv) é transcrito em RNA mensageiro (RNAm), que é incorporado ao novo RNA. A iniciação da síntese do RNAm ocorre por fragmentos derivados das recém-formadas oriundo da transcrições de RNA polimerase II da célula e a transcrição termina pela adição da cauda poli-A (poliadenilada) ao RNAm. A replicação do RNAv acontece com a síntese dos RNA moldes (cópias de tamanho total do RNAv). Os três tipos de RNA que existem durante a replicação (RNAv, RNA molde e RNAm) são sintetizados no núcleo da célula infectada. Esse fato comprovado para o vírus da Influenza da qual o RNAm (ácido ribonucléico mensageiros) contem, internamente, resíduos de N-6-metiladenosina, que só são encontrados em mRNAs de origem nuclear (KRUG et al., 1976).

O mecanismo de processamento do RNAm viral é o mesmo dos precursores celulares, permitindo a metilação do RNAm em resíduos de adenosina e dois

segmentos de RNAm como precursores, são processados resultando em fragmentos de RNAm menores. Iniciadores da célula, os fragmentos de RNA derivados de transcrições de RNA polimerase II iniciam a síntese de RNAm no núcleo. Esse mecanismo exige o suprimento continuado de RNA polimerase II celular plenamente funcional e justifica a inibição da síntese de RNAm por actinomicina D e A-amantadina.

1.11.3 Transcrição

O RNAm é dirigido pelo penúltimo resíduo de citosina do RNAv e é alongado até atingir os 5 a 7 resíduos de uridina 15-22 nucleotídeos do final 5' do RNAv. Quando a cauda poli-A é adicionada à extremidade 3' do RNAm encerra o mecanismo de transcrição (LAMB; KRUG, 2007). O complexo enzimático está envolvida nas cópias de RNAv e na síntese dos moldes complementares. As transcriptases estariam envolvidas na síntese de RNAm. Os papéis das proteínas não estruturais NS1 e NS2 são responsáveis pela exportação de RNAm (viral) clivado do núcleo (RNAm celulares) e a de clivagem da fase pré-RNAm (viral).

Seis entre os oito proteínas são transcritos por mecanismo monocitrônico HA, NA, NP, PB1, PB2, e PA. Duas proteínas restantes dos RNAs são transcritos em mRNAs e translado para proteínas M1, M2, NS1 e NS2. As proteínas M1 e M2 são importantes para que ocorra a migração RNA para o citoplasma e para os rearranjos dos componentes virais. Finalmente o complexo RNP - M1 interage com a proteína M1 os quais estão associados à membrana plasmática (WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007; HORIMOTO; KAWAOKA, 2001). A Neuraminidase pode ser detectada, 3 horas após infecção, no citoplasma. As proteínas PB2, NP e NS são os três primeiros polipeptídeos que aparecem na célula infectada e supõe-se que sejam uma transcrição de três segmentos do genoma viral pela polimerase viral (LAMB; KRUG, 2007).

1.11.4 Tradução

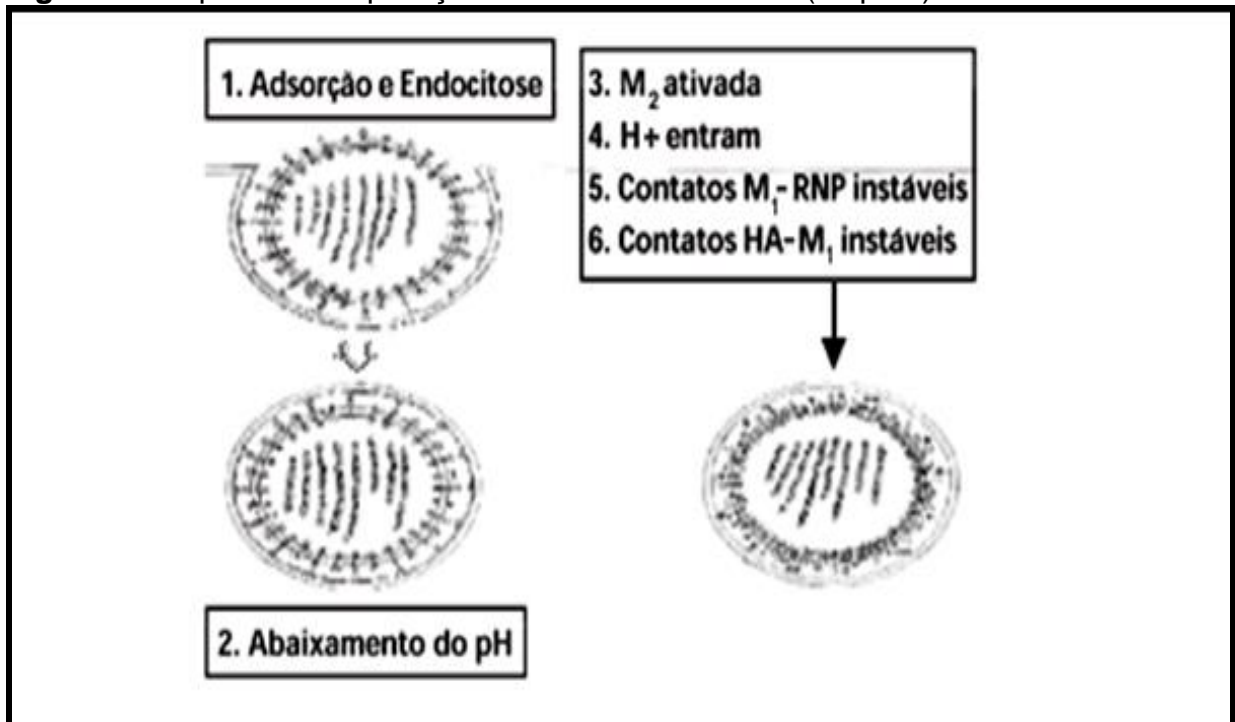
Durante a infecção pelos vírus da influenza sucedem mudanças na síntese de proteínas celulares para proteínas virais, acondicionadas por processos nucleares e

citoplasmáticos. Embora haja no núcleo a degradação das transcrições de mRNA celular, tal mecanismo não explica a interrupção da tradução de mRNA celular, pois há muitos mRNA celulares funcionais no citoplasma. A interrupção da tradução dos mRNA celulares tem lugar 3 horas após a infecção de diversos tipos celulares. Não ocorre por degradação ou modificação do mRNA celular, mas se deve à interrupção da iniciação e alongamento das traduções. A iniciação da tradução é seletiva e privilegia mRNA viral por serem muito eficientes os iniciadores desses (LAMB; KRUG, 2007).

1.11.5 Brotamento

As células infectadas ao microscópio eletrônico permitem a visualização dos vírus Influenza na membrana plasmática. As proteínas da célula hospedeira não são incluídas na estrutura do envelope viral e, a exemplo de algumas proteínas virais não transportadas para a membrana, são excluídas. As associações protéicas envolvidas no brotamento viral (incluem contatos entre M1, ligada à dupla camada lipídica e a nucleoproteína NP). Os sítios citoplasmáticos da HA tem o papel de permitir as interações entre o envelope viral e seus componentes internos no processo de seleção das proteínas a serem montadas no vírion (NAIM; ROTH, 1993). O processo de liberação se inicia com a formação do envoltório em regiões da membrana celular na qual são incorporadas as proteínas do envoltório viral. Nele há presumível associação da matriz protéica (M) com RNA, seguido de mecanismo de pinocitose inversa, isto é, uma saída de substância do interior da célula, carreando parte da membrana celular (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; WRIGHT; NEUMANN; KAWAOKA, 2007).

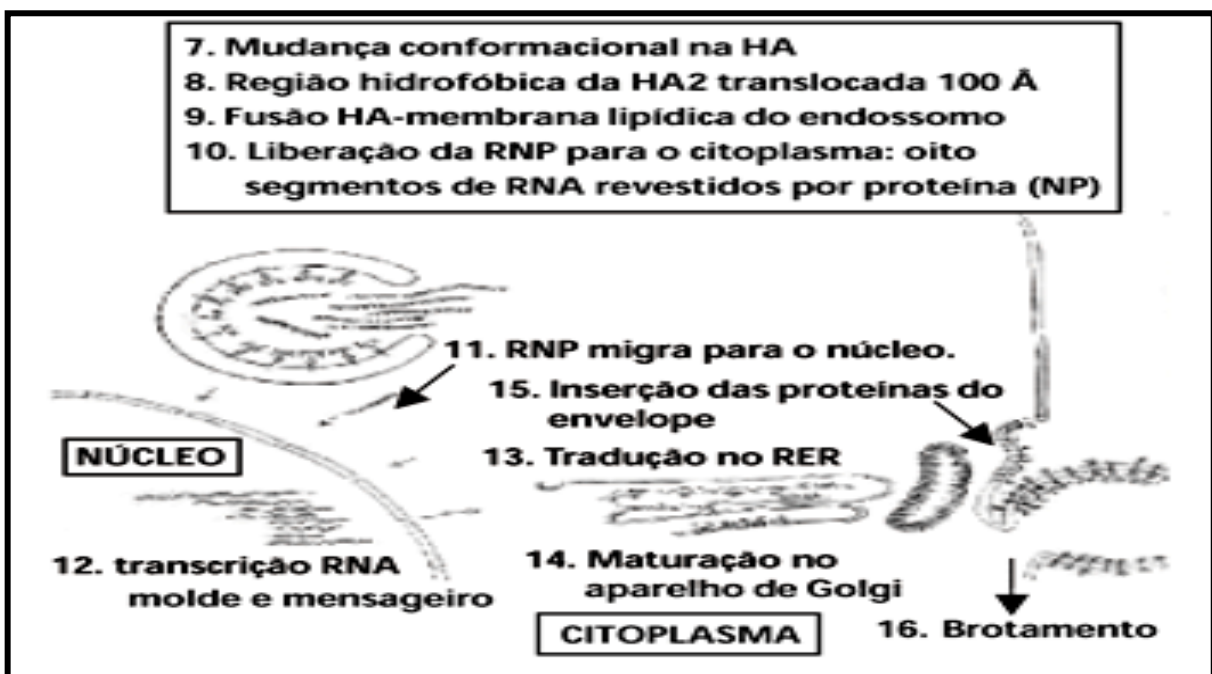
Figura 9- Esquema de replicação do Vírus da Influenza (etapa 1)



Nota: 1- Adsorção e endocitose. 2- pH ácido nos endossomos. 3- Ativação do poro iônico. 4- Entrada dos íons H⁺. Ligação M₁-RNPM1 com HA.

Fonte: Martins (2001)

Figura 10- Esquema da Replicação do Vírus da Influenza (etapa 2)



Nota: 7- Mudança conformacional na HA. 8- Translocação da região hidrofóbica da HA2. 9-Fusão das HA e dupla camada lipídica do endossomo. 10- Liberação RNP para o citoplasma. 11- Migração do RNP para o núcleo. 12- Transcrição do RNP no núcleo celular. 13- Tradução do RNAm no retículo endoplasmático rugoso(RER). 14- Maturação no aparelho Golgi. 15- Inserção das proteínas do envelope na membrana celular. 16- Brotamento.

Fonte: Martins (2001)

1.12 Variação antigênica

1.12.1 Os tipos "drift"

São variações ocorridas, nas glicoproteínas superficiais (HA e NA) de um dado subtipo, na sequência de aminoácidos da cadeia de polipeptídeos dos antígenos dos vírus da influenza humana e de outros mamíferos. Foram relatadas cepas aviárias de subtipo H5, H7 que sofreram mutações na região de glicoproteína superficial nos níveis de Hemaglutininas e neuraminidase (FOUCHIER et al., 2004). As amostras A/Chicken/Netherlands/1/03 (H7N7) e A/Netherlands/3/03 (H7N7) que possuem a mesma identidade patogênica apresentaram alteração na região de clivagem um composto de protease de base múltiplo de aminoácidos (FOUCHIER et al., 2004; KOOPMANS et al., 2004).

1.12.2 Os tipos "shift"

Esta variação resulta de grandes mutações do genoma viral. Estas mutações são ocasionadas pela inserção de um dos segmentos do RNA de vírus animal no vírus humano ou de espécies diferentes de aves codificando uma nova glicoproteína de superfície, genoma híbrido que pode possuir pouca ou nenhuma homologia sorológica com a cepa anteriormente predominante (SHARP et al., 1997; SHOLTISSEK, 1994).

Os estudos filogenéticos revelaram evidências de que o vírus aviário, responsável pelas infecções humanas e morte na China em 1997 foi originado, de recombinações genéticas de vários subtipos influenza aviárias: A/goose/Guanddong/1/96 (H5N1), A/quail/Hong Kong/G1/97 (H9N2) e A/teal/Hong Kong/W312/97 (H6N1) desenvolvido em um hospedeiro. O subtipo A/Hong Kong/97 (H5N1) causal possui o genoma viral idêntica a do A/quail/Hong Kong/G1/97 (H9N2) e a neuraminidase semelhante a do vírus A/teal/Hong Kong/W312/97 (H6N1) (GUAN et al., 1999; HOFFMANN et al., 2000).

1.13 Patogenicidade

Os vírus de Influenza A que infectam aves domésticas são divididos em dois grupos com base na habilidade de causar a doença. O vírus de Influenza que apresentam alta patogenicidade (HPAI) e baixa patogenicidade (LPAI) ambas apresenta morbidade e mortalidade por doenças respiratórias na população de aves. (ALEXANDER, 2000, 2001).

Os vírus A/FPV/Dutch/27 (Hav1Neq1), A/turkey/England/63 (H1N3), A/chicken/Scotland/59 (H5N1), A/tern/SouthAfrica/61 (H5N3) e A/chicken/Hong Kong/258/97 (H5N1), são considerados altamente patogênicos e todos causam elevadas taxas de morbidade e mortalidade, em condições naturais (CLASS et al., 1997). Porém, em estudos posteriores, foi constatado que a patogenicidade pode ser variável quanto às espécies. Em inoculação experimental, quando efetuados em pombos e galinhas, com as amostras A/chicken/Pensylvania/1370/83 (H5N2) e A/chicken/Australia/32972/85 (H7N7) por via óculo-nasal e intravenosa, demonstrou alta letalidade em galinhas, com isolamento dos vírus, porém, nada foi constatada em relação aos pombos (PANIGRAHY et al., 1996).

1.14 Infecções interespecies

A primeira constatação de infecção interespecie, na natureza, refere-se ao vírus Hsw1N1, responsável pela pandemia de 1918 (SMITH et al., 1933), embora esta constatação tenha sido feita só por sorologia retrospectiva.

Os vírus das aves e de humanos que co-infectam porcos, sofrem recombinações genéticas e adaptações, com ressurgimento de nova cepa híbrida, altamente patogênica, que pode infectar de forma direta, humanos susceptíveis, acarretando casos fatais (SHAFER et al., 1993; WEBSTER, 1997).

Infecções interespecies foram experimentalmente obtidas em laboratório, utilizando-se inoculações de vírus de origem aviária em humanos, suínos, macacos, cobaias e camundongos (WEBSTER, 1997). Quando, em 1970, isolou-se de suínos o vírus A/Hong Kong/68 (H3N2), ficou, mais uma vez, determinada a possibilidade de infecções interespecies (KUNDIN, 1970).

Na Itália, existiam circulando na população de porcos uma cepa que contém seis segmentos de vírus de aves e dois segmentos de vírus humanos (SHORTRIDGE,

1979; YAMANE et al., 1979; WEBSTER, 1997). Ficou documentado que os perus podem ser infectados tanto por subtipos H1N1 como do subtipo H1N2. A análise das sequências do RNA viral do subtipo do vírus A/Swine/indiana/9K035/99 (H1N2) encontradas na população de suíno em Indiana nos Estados Unidos da América (EUA), demonstrou tratar - se de um complexo de recombinação genética, mistura de suíno - humano originada do gene aviário. (KANG et al., 2011; SUAREZ; SENNE 2002).

Lee et al. (2010) realizaram um estudo de desafio animal usando galinhas, codornas, ratos e cães demonstrando que os subtipos H4 e H6 poderiam replicar em ratos e frangos sem preadaptação. Além disso, dois vírus subtipos (H3N2 e H3N8) circulantes em patos foram isolados de cães que apresentaram sinais clínicos de pneumonia intersticial e soroconversão. Tais dados comprovam a existência de evolução contínua e transmissão interespecíes de vírus de influenza nos mercados de aves domésticas.

1.15 Transmissão

A possibilidade de transmissão vertical foi levantada devido ao isolamento do vírus A/chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) da cavidade interna do ovo (albumina, gema e câmara de ar), durante a infecção natural de perus na Pensilvânia e Virgínia - EUA (CAPPUCCI et al., 1985).

A transmissão direta já foi observada em galinhas saudáveis, que permaneceram à distância de 3 metros de outras galinhas inoculadas, com desenvolvimento da doença e com resposta antigênica (FORMAN; PARSONSON; DOUGHTY, 1986). Os vírus da influenza aviária multiplicam-se nas células que revestem o trato intestinal, fato constatado pelos isolamentos efetuados de material de cloacas (HORIMOTO; KAWAOKA, 2001; SHORTRIDGE, 1979; SINNECKER et al., 1983; WEBSTER et al., 1976; YAMANE et al., 1979). São eliminados em grande concentração, na água, onde permanecem viáveis por dias, fato confirmado pelo isolamento do subtipo H5N1 e H13N2 de águas e de perus e galinhas do mesmo local (LAUDERT et al., 1993; TRAMPUZ et al., 2004). Pássaros domésticos, mamíferos e seres humanos podem se contaminar quando em contato, com este tipo de água (EASTERDAY; TUMOVÁ, 1978; SHARP et al., 1997; TRAMPUZ et al.,

2004). Em conclusão a transmissão para as aves doméstica pode ocorrer por contato e por águas contaminadas pelas fezes de aves silvestres e migratórias portadoras de Influenza A (LAI; PHILLIPS, 1999; WEBSTER et al., 1976; WEBSTER 1997).

A hipótese de transmissão pelas fezes é fundamentada pela facilidade de isolamento do vírus neste material. A transmissão do vírus da influenza entre pássaros e mamíferos, inclusive seres humanos, antes consideradas serem improvável, sobretudo nas transferências pelas vias respiratórias, devido à especificidade de replicação em seus respectivos hospedeiros. Vez, por outra, as cepas aviárias, ao serem adaptadas em outras espécies ou mamíferos, podem desencadeiam transmissão direta entre espécies, pela via oral (SINNECKER et al., 1983; WEBSTER, 1997; YAMANE et al., 1979).

Com os vírus *A/chicken/Hong Kong/258/97* (H5N1), *A/England/268/96* (H7N7) e *A/Chicken/Hong Kong/G9/97* (H9N2) supõem-se que tenha ocorrido transmissão das galinhas infectadas para humanos, sem serem correlacionada com o hospedeiro mamífero intermediário (CLAAS et al., 1998; LIN et al., 2000).

1.16 Diagnósticos laboratoriais

De um modo geral, são colhidos "swabs" da traquéia e cloaca das aves que são colocados num meio de transporte estéril, contendo glicerol a 25% - 50%, ou em um meio de manutenção de cultura de células com antibióticos. Se o material for testado até 48 horas após a coleta, pode-se conservar a 4 °C. Caso não seja possível neste período de tempo, utiliza-se congelador mecânico a -70 °C, gelo seco ou transporte em balão de nitrogênio líquido (EASTERDAY; TUMOVÁ, 1978; FATUNMBI et al., 1993).

Das aves mortas podem ser congeladas amostras de tecidos que quando infectados podem ser detectada a presença do vírus da Influenza, utilizando a técnica de Imunocitoquímica (INPANBUTR; SLEMONS, 1993).

1.16.1 Sistema de Cultivo Viral

Todos os vírus da Influenza replicam - se em ovos embrionados, inoculados por via amniótica ou alantoíca, para tal, utilizam-se embriões com 9 a 11 dias, após a

inoculação, são incubados por 48 a 72 horas, a 33 °C. Não deve utilizar embriões de mais de 13 dias, produzem protease que é capaz de destruir a hemaglutinina dos vírus, favorecendo a replicação dos vírus mutantes, inibindo os vírus patogênicos (HORIMOTO; KAWAOKA, 1998).

As amostras aviárias replicam-se em culturas de células renais de macaco (VERO) e de rim de cachorro (MDCK). Foram também, evidenciados feitos citopáticos em fibroblastos de embrião de pinto. As células epitelióides, derivadas de órgãos completamente formados, possuem maior sensibilidade para os vírus de influenza do que as originárias de órgãos em estado embrionário. Embora mantenham esta característica em passagens sucessivas, estas células possuem maior susceptibilidade ao vírus da Influenza nos cultivos primários (DOWDLE et al., 1975).

A célula linhagem contínua de rim de macaco verde (VERO) apresentou susceptibilidade semelhante à da célula de linhagem contínua de rim de cachorro (MDCK), para isolamento e replicação do vírus do subtipo H3N2 humano (GOVOROVA et al., 1995).

No estudo efetuado, foram relacionadas três linhagens celulares: célula de rim de cachorro (MDCK), célula embrionada de pulmão humano (MRC-5) e célula de rim de macaco verde (VERO). Destacou-se a célula MDCK, como sendo a mais indicada para o isolamento de vírus da Influenza humana (REINA et al., 1997).

1.16.2 Identificação do Vírus

Os líquidos alantóicos que são positivos no teste de Hemaglutinação (HI) e, portanto contém vírus, são separados em alíquotas e conservados a -70 °C. Uma das frações do líquido alantóico é usada para o teste de HI, com soro anti-Doença Newcastle, para determinar que não se trata deste vírus. Caso Inibição de Hemaglutinação (HI) com antissoro para Newcastle, seja negativo. Segue-se a identificação da Hemaglutinina (HA), utilizando-se anti-soros contra todos os subtipos de HA ou aqueles produzidos em animais susceptíveis, como o furão, pela reação de Inibição da Hemaglutinação, Imunofluorescência direta e indireta com monoclonal específico (SUBBARAO et al., 1998) e Reação de Imunoenzimático ELISA por captura de antígeno (DAVISON et al., 2003), Transcriptase Reversa – PCR / Reação de Imuno ensaio ELISA (MUNCH et al., 2001). RT-PCR para detectar

gene específico das Hemaglutininas, Neuraminidase, Proteína M da matrix, NS (CHAN et al., 2002), PB1 (NATH; NAYAK, 1990), PB2 (MUKAIGAWA; NAYAK, 1991) e NP (NEUMANN; CASTRUCCI; KAWAOKA, 1997; WANG; PALESE; O'NEILL, 1997) e RT/PCR MULTIPLEX amplificação de todos segmentos (HOFFMANN et al., 2000).

2 OBJETIVO

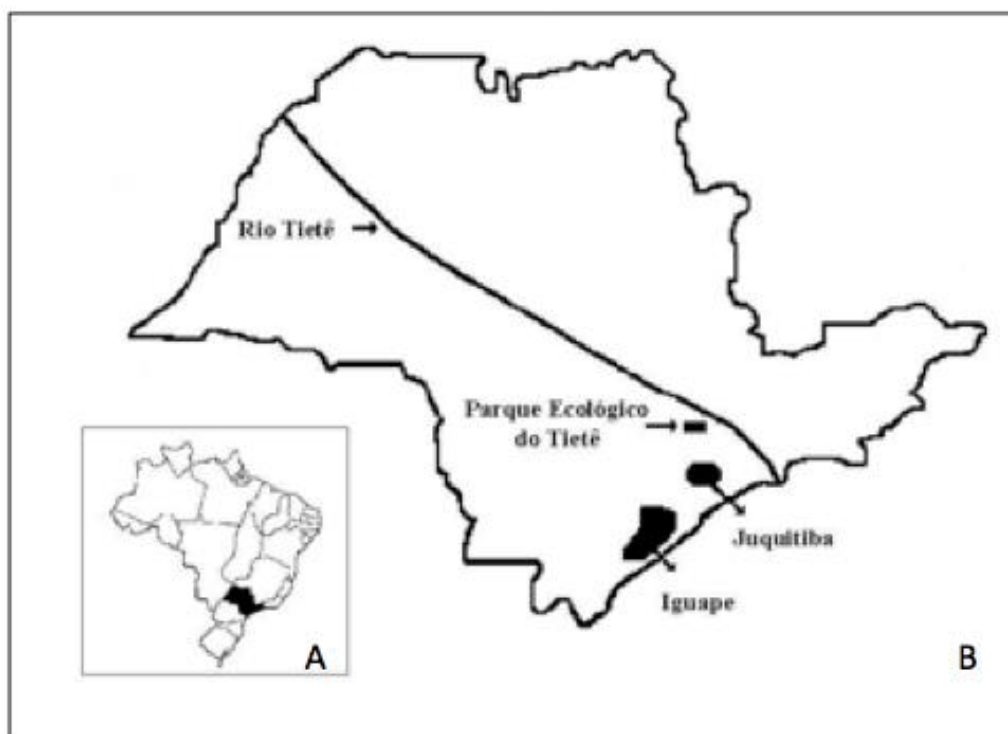
O Presente trabalho tem como objetivo a caracterização sorológica e Molecular de amostras de vírus Influenza A isoladas, de aves silvestres residentes e migratórias no Estado São Paulo entre os anos de 1997 e 1998.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Regiões de coleta de amostras

Foram capturadas aves silvestres migratórias e residentes de três regiões distintas do Estado de São Paulo que estão demonstrados na figura 11.

Figura 11- Locais de captura de aves silvestres



Nota: Figura A representa o mapa do Brasil com o Estado de São Paulo em destaque Negro. A figura B representa o mapa do Estado de São Paulo e as regiões em negro são as localizações experimentais de capturas de aves deste trabalho.

3.1.1 Município de Guarulhos/SP

O Parque Ecológico do Tietê ($23^{\circ} 29'S$, $46^{\circ} 30'W$) está situado nas proximidades do Aeroporto Internacional de Cumbica – SP, tem uma área verde com fauna nativa e introduzida as quais, aves silvestres e migratórias as utilizam como local de descanso e fonte de alimentação. Na época de coleta a temperatura estava entre $25^{\circ}C$ e $35^{\circ}C$.

3.1.2 Município de Iguape/SP

A região de coleta deste município está situado no Vale do Ribeira (24°39'S,47°25'W) e na época da coleta apresentou condições climáticas úmida e chuvosa. Há a predominância de aves silvestres nativas e migratórias, devido à proximidade litorânea e também de mamíferos silvestres e domésticos de grandes e pequenos portes, além de morcegos.

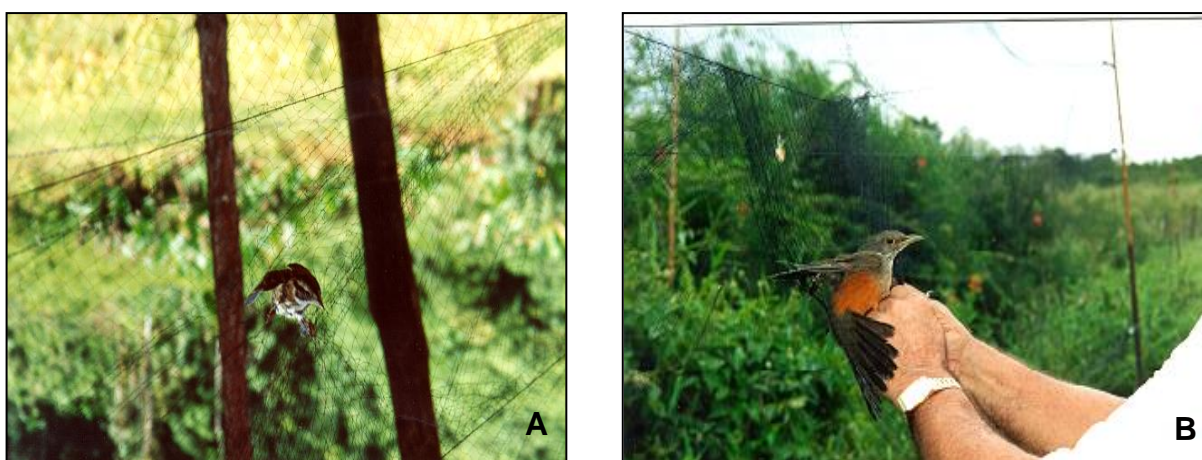
3.1.3 Município de Juquitiba/SP

A região de coleta deste município (23°50'S,47°02'W) possui característica típica de Mata Atlântica, com predominância de aves silvestres nativas e migratórias e mamíferos de pequeno e grande porte. O período da coleta foi na época de chuvas e com temperaturas variando entre 25 °C e 40 °C.

3.2 Captura das aves

As aves foram capturadas em redes de espera ("Mist-nets") de 12 metros de comprimento por 3 metros de altura, totalizando 30 horas-rede por período de captura, seguindo as normas do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos) (figura 12 A e B).

Figura 12 A e B - Técnica de captura das aves silvestres por rede de espera.



Nota: As figuras demonstram a captura (A) e a retirada (B) das aves da rede de espera.

Após a captura as aves foram classificadas, anilhadas e coletadas amostras de swab cloacal e oral pelo Biólogo-ornitólogo da equipe e os dados foram armazenados, para posterior utilização.

3.3 Amostras

Foram capturadas 37 espécies de aves migratórias e residentes e coletadas destas aves, 69 amostras de swabs (cloacal e oral). Estes swabs foram armazenados em 1 ml de meio de cultura 199, tamponada ao pH 7.2, contendo 1.0% de albumina bovina, 2.000 unidades de penicilina G; 2,5 µg de estreptomicina, 6 µg de gentamicina, 25 µg de fungizone e 20% de glicerina (SINNECKER et al., 1983; WEBSTER et al., 1976; YAMANE et al., 1979). As amostras foram transportadas em balão de nitrogênio líquido, a 196^oC, até o laboratório e estocadas em *freezer* -70^oC.

Para o desenvolvimento da Dissertação de Mestrado da Kawamoto (1999) As amostras foram inoculadas em ovos embrionados e cultivadas em culturas celulares da linhagem NCI-H292 e MDCK para isolamento viral, segundo Hirst (1941) e Ito et al. (1997) e realizados testes sorológicos e moleculares.

Para observar os efeitos citopáticos em culturas celulares com presença de hemaglutinina viral foram utilizados teste de Hemadsorção segundo Minnich (1987). As características morfológicas dos vírus isolados foram observadas por microscopia eletrônica utilizando a Técnica de contrastação negativa em suspensões virais, segundo Doane e Anderson (1987), Fonseca et al. (1984).

Para a detecção da nucleoproteína (NP) do vírus da Influenza, foi utilizada uma reação imunoenzimática denominado de Teste Rápido para Influenza A/B (gold-labeled-optically-read-immunoassay-Roche Technology) (KAWAMOTO et al., 2002).

A Reação em cadeia mediada pela Polimerase (PCR, do Inglês – Polymerase Chain Reaction) após transcriptase reversa (RT) foi realizada para detectar o gene específico para influenza A vírus utilizando o *primer* PcDNA (Flu) que amplificou um fragmento 189 pb do gene NS1 (PODAR et al., 2002; SOARES et al., 2005). Pela PCR foram obtidas 14 ampliações que foram utilizadas para a realização da tese de doutoramento de Adélia Hiroko Nagamori Kawamoto.

3.4 Caracterização sorológica do vírus da Influenza Aviária

3.4.1 Soros padrões utilizados na reação de HI para Subtipagem

As 14 amostras positivas tipificadas no mestrado para influenza A, foram subtipadas pelo teste sorológico de Inibição de Hemaglutinação (HI) com 21 soros imunes e antígenos padrões de 15 subtipos de Influenza A distintos: A/PR/8/34(H1N1), A/FM/1/47(H1N1), A/Swine/A/30(H1N1), A/Japan/305/57(H2N2), A/HongKong/8/68(H3N2), A/equine/Miami/65(H3N8), A/duck/Ukraine/63(H3N8), A/duck/Czech/56(H4N8), A/tern/So.Af./61(H5N8), A/turkey/MA/65(H6N2), A/equine/Prague/56(H7N7), A/FPV/Rostock/34(H7N1), A/turkey/Ont./6118(H8N4), A/turkey/WI/66(H9N2), A/chicken/Germany/49(H10N8), A/duck/England/56(H11N8), A/duck/Memphis/546/74(H11N9), A/duck/Albert/60/76(H12N5), A/gull/MD/707/77 (H13N5), A/mallard/Ast./263/82(H14N5), A/shearwater/W.Aust./79(H15N8) e como controle negativo Influenza tipo B/Lee/40. Os soros e antígenos foram gentilmente cedido pelo Dr. Robert G. Webster de St. Jude Faculty, Memphis, TN-EUA.

3.4.2 Tratamento de Soros Padrões

Para retirar os inibidores inespecíficos presentes nos soros, foi utilizada solução de caolin a 20% em solução borato (pH - 9,0) na proporção 1:1. A seguir a mistura foram agitadas e descansada por 20 minutos em temperatura ambiente. Foi adicionado, a esta mistura, 50 µL de suspensão de hemácias de galo a 50% em PBS e deixados por 1 hora a 4°C. Após esta incubação os soros tratados foram centrifugados a 2.000 rpm (Centrifuge 5804R Eppendorf- rotor F45-36-8), por 30 minutos. Os sobrenadantes foram coletados e acondicionados em geladeira a 4°C, por uma noite, ou em *freezer* -20°C, até a realização do teste de Inibição de Hemaglutinação (MANCINI; VILELA; MOREIRA, 1987; MANCINI et al., 1996).

3.4.3 Reação de Inibição de Hemaglutinação

Os soros tratados com caolin foram titulados em diluições seriadas, múltiplos de dois, a partir de 1:20 em 25 µl de solução de tampão (PBS), utilizando-se pipetas multicanais de 25 µl de capacidade, em microplacas de 96 orifícios, de

fundo V, descartáveis, (polietileno, Cooke, USA). Em cada diluição de soro foram adicionados 25 µl de antígeno, previamente dosado em 4 Unidades Hemaglutinantes. Depois de agitadas, as placas foram mantidas a temperatura ambiente por 30 minutos. Acrescentou-se, 50 µl de hemácias de galo a 0,5% em cada orifício com soro e antígeno. Após homogeneização, as placas foram colocadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Considerou-se o título inibidor da hemaglutinação a maior diluição do soro capaz de inibir completamente a hemaglutinação das hemácias. O controle negativo dos soros foi processado com 50µl de solução salina tamponada e 50 µl de soro não reagente na proporção de 1:10 e suspensão de hemácias a 0.5% e o controle do antígeno foi feito com substituição do soro por salina tamponada (MANCINI; VILELA; MOREIRA, 1987; MANCINI et al., 1996).

3.5 Caracterização Molecular do vírus da Influenza Aviária

Foram testadas para Influenza A, as amostras de Swab Cloacal denominadas por: LE6712, LE6715, LE6735, LE6744, LE6745, LE6751, LE6780, LE6781, LE6782, LE6783, LE6784, LE6840, LE6841, LE6844 e C+ A/Beijing/353/89(H3N2).

3.5.1 Extração do RNA total

Para a extração do RNA total foi utilizado, 250 µl de amostra do líquido alantoide colhida de ovos embrionados, a seguir acrescida de 750 µl de Trizol LS. Todo o processo de extração foi realizado em banho de gelo, centrifuga refrigerada e reagentes gelados (Centrifuge 5804R Eppendorf). foram adicionados 200 µl de clorofórmio e álcool isoamílico 24:1 (Merck-Sigma) e homogeneizados em vórtex por 15 segundos seguido de incubação em banho de gelo por 5 minutos e centrifugadas a 12.000G por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa, cerca de 400 µl, foi transferida para outro tubo e o RNA foi precipitado pela adição de isopropanol (Merck) na proporção de volume a volume, seguido de homogeneização em vórtex, incubação em banho de gelo por 15 minutos e centrifugação a 12.000 rpm (Centrifuge 5804R Eppendorf) por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e o

precipitado lavado com 800 µl de etanol a 75% (Merck) diluído com água Milli-Q® tratada com DEPEC (Dietilpirocarbonato – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), seguido de centrifugação a 8.000 rpm por 8 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado por inversão do tubo e o RNA precipitado e seco foi hidratado em 80 µl de água tratada com DEPC + 40U de inibidor de RNase (Rnasin® - Promega).

3.5.2 Obtenção do cDNA com primers Randômicos

A transcrição reversa (RT) foi realizada com o auxílio do *High Capacity cDNA Archive kit*, conforme instruções do fabricante (*Applied Biosystems® Inc., EUA*). Uma alíquota de 50 µl do RNA extraído foi diluído em tampão de reação contendo 50 pmoles de *Random primers*, 50 mM de Tris-HCl [pH 8.3 a 25 °C] / 75 mM de KCl / 3 mM de MgCl₂ (10x RT Buffer), 10 mM de Dithiothreitol, 50 U/µl de MultiScribe RT enzyme, 0,2 U de Inibidor de RNase, 1,5 mM dNTP mixture e água UltraPure (Gibco®) para um volume final 100 µl. A mistura foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguida de 37°C por 120 minutos sendo utilizado o *termomixer Confort* (Eppendorf, EUA).

3.5.3 Triagem das amostras para Vírus da Influenza

A reação de PCR para a triagem foi realizada utilizando o cDNA randômico (**seção 3.5.2**). A amplificação foi efetuada utilizando 10 µl de cDNA (do produto diluído 1:5) em tampão 20 mM de Tris-HCl [pH 8.4] / 50 mM de KCl / 2 mM de MgCl₂, 12,5 pMoles de cada primer (tabela1), 1,5 U de Taq DNA Polimerase (Applied Biosystems), 0.2 mM de cada dNTP e água UltraPure (Gibco®) para um volume final de 50 µL. As amostras foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (*Applied Biosystems Inc., EUA*), a partir de uma etapa a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 1 minuto para desnaturação das fitas; 54°C por 1 minuto para o *annealing*; 72°C por 1 minuto para extensão e uma etapa final de 72°C por 7 minutos para completar a extensão. Os produtos amplificados foram estocados a 4°C.

Tabela 1- Primers utilizados na reação da PCR para Triagem dos vírus de Influenza nas amostras estudadas.

Primer ID	Gene	Location	Polarity	sequencia (5'>3')	Tamanho do Amplicon (pb)
FLUA-F1-FAM	NS1	467-486	Positive	CTAAGGGCTTTCACCGAAGA	192
FLUA-R1		637-656	Negative	CCCATTCTCATTACTGCCTTC	

Fonte: Thomazelli et al. (2007)

3.5.4 Análise dos produtos amplificados

A detecção do produto amplificado foi realizado por eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL[®]) a 1,5% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de EDTA [pH 8.0]) e 0,5 µg/mL brometo de etídeo. Uma alíquota de 10 µl da amostra do produto de PCR foi diluído em 2 µl de azul de bromofenol (*loading buffer*) e submetida à eletroforese em cuba horizontal (Gibco BRL[®]), imerso em tampão TBE (1x concentrado) durante 40 minutos a 100 V. A visualização do gel foi realizada em trans-iluminador de luz ultravioleta (UV).

3.6 Subtipagem dos vírus de Influenza A

As amostras positivas na triagem descrita na seção 3.5.4 foram novamente amplificadas, entretanto utilizando o cDNA com o *primer* específico (UNI12). Os primers utilizados na reação para subtipar Influenza A, utilizando a aplicação da HA e NA (H1 e H3; N1 e N2) foram gentilmente cedido pelo Dr. Martin Schutten da *Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands* já diluídos em 20 pM cada dupla de *set* e nomeados como HA⁺wd⁻² / HA³⁺-4⁻ / HA⁵⁺-6⁻ / HA⁷⁺-Rev⁻ para hemagutina; NA⁺wd⁻² / NA³⁺-4⁻ / NA⁵⁺-6⁻ / NA⁷⁺-Rev⁻ para a neuraminidase.

3.6.1 Obtenção do cDNA com primer Uni12

Em uma mistura de reação contendo (*mix1*) 23 μL de amostra extraída, 1 μL de *Primer Uni12* [20 pm/ μL] (HOFFMAN, 2002), 2 μL de dNTP [10 mM], 1 μL de RNAsin (InvitrogenTM) e incubado por 5 minutos a 60^oC seguido de 1 minuto em gelo foi adicionado treze microlitros de *mix 2*, composto por: 8 μL de tampão de reação (InvitrogenTM), 2 μL de DTT (InvitrogenTM), 1 μL de RNAsin (InvitrogenTM) e 2 μL de Enzima de RT MUL-V [200U/ μL] (InvitrogenTM). Decorrido 1 minuto em gelo a mistura do *mix 1* com o *mix 2*, foi incubada por 5 minutos a 25^oC seguida de 60 minutos por 50^oC. Após a obtenção do cDNA, o mesmo foi diluído em água DEPEC na proporção de 1:5 e armazenado em freezer -70^oC até o momento de seu uso.

3.6.2 Amplificação da Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA)

Para a amplificação das duas proteínas (HA, NA) foram realizadas 8 reações independentes, obtendo um total de 8 produtos de PCR, quatro produtos para cada proteína de cada amostra testada (Fig. 13), seguindo o seguinte protocolo: mix contendo 33 μL de H₂O UltraPure (Gibco[®]), 5 μL de tampão da reação [20 mM de Tris-HCl [pH 8.4] / 50 mM de KCl / 2 mM de MgCl₂], 1 μL de dNTP [10 mM], 1 μL de Taq polymerase [1 U/ μL] e 2 μL de mix-primer [20pM de cada] em 8 μL de cDNA, volume final de 50 μl por reação (tabela 2). As amostras foram amplificadas em termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems Inc., EUA), a partir de uma etapa a 95^oC por 10 minutos, seguida de 35 ciclos a 94^oC por 15 segundos para desnaturação das fitas; 55^oC por 30 segundos para o *annealing* dos *primers*; 72^oC por 45 segundos para extensão e uma etapa final de 72^oC por 7 minutos para completar a extensão. Os produtos amplificados foram estocados a 4^oC.

Figura 13 - Representação do cronograma de trabalho utilizado do teste de PCR para análise de HA e NA.

FLUA A/H3N2 Prot HA/NA		AMOSTRAS ADÉLIA		PCR* 17/06/2010		CICLO: 95/5m – 95/15s + 50/30s + 72/45s – 72/7m-4/∞							
						40x							
		(6712)	(6715)	(6744)	(6745)	(6751)	(6780)	(6781)	(6782)	(6783)	(6784)	(6841)	(6844)
H A	A	HA fwd HA2 HA	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2	HA fwd HA2
	B	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4	HA 3 HA4
	C	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6	HA 5 HA6
	D	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.	HA 7 HA rev.
N A	E	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2	NA fwd NA2
	F	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4	NA3 NA4
	G	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6	NA5 NA6
	H	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.	NA7 NA rev.

1 amostra	11 amostra (Diluir 40µl do cDNA em 120µl de H ₂ O).
H ₂ O – 31,5µl	H ₂ O – 346,5µl
Buf – 5µl	Buf – 55µl
MgCl ₂ – 2,0µl	MgCl ₂ – 22µl
dNTP(10pM)– 1µl	dNTP(10 pM)– 11µl
Taq (2U/µl) – 0,5µl	Taq (2U/µl)– 5,5µl
Mix Primer– 2,0µl	

Distribuir 40µl de mix em 2µl de primer e 8µl de cDNA diluído

Nota: Figura representativa da *Sample sheet* utilizada na reação da PCR para a amplificação das proteínas Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA). Em cada Coluna tem-se as amostras e em cada fileira, tem-se os pares de primers para a amplificação da HA e NA.

3.6.3 Análise dos produtos amplificados

A detecção do produto amplificado foi realizado por eletroforese em gel de agarose (Gibco BRL[®]) como descrito na seção 3.5.4.

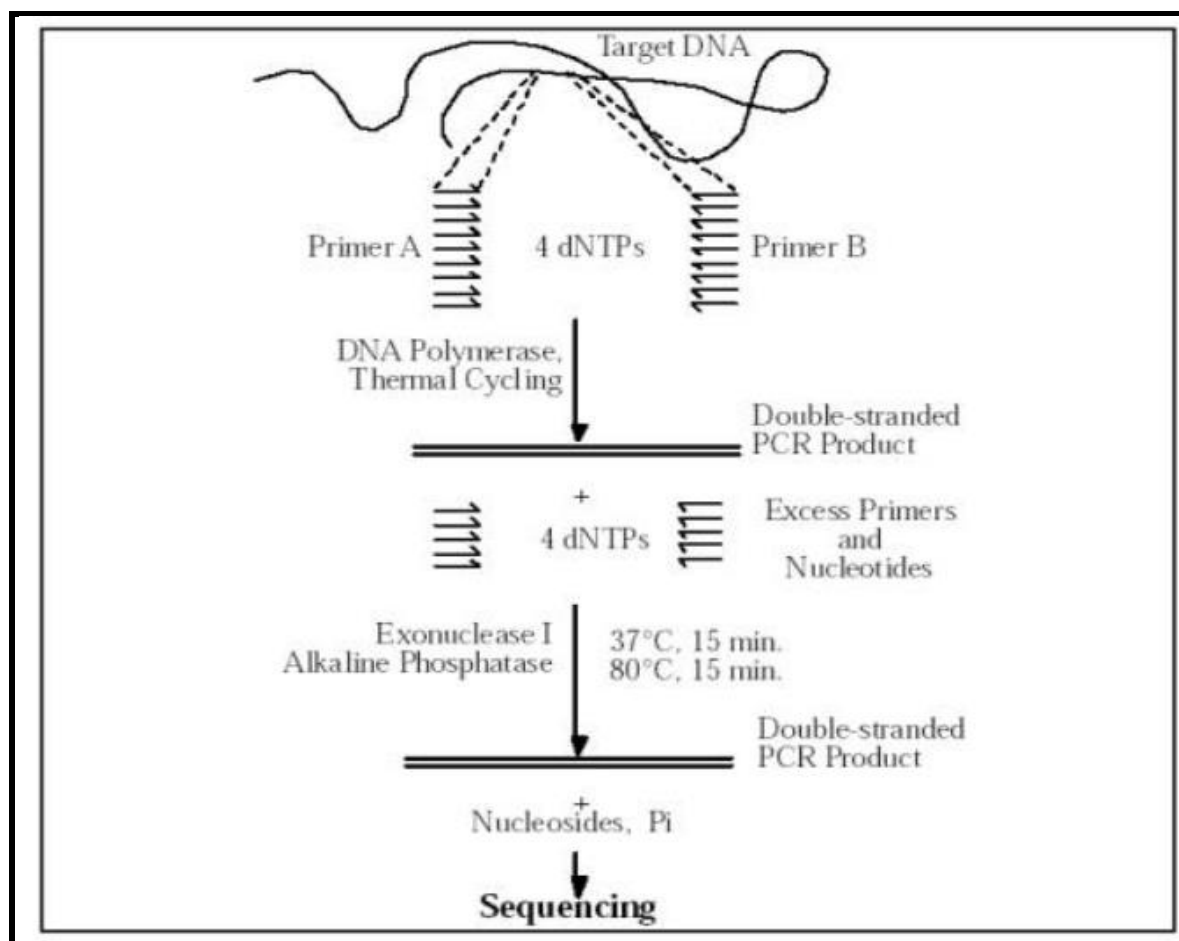
3.7 Sequenciamento das Proteínas HA e NA

3.7.1 Purificação dos produtos amplificados

Para reação de PCR foram utilizada dois *primers* (*forward* e *reverse*), dNTPs e DNA polimerase para produzir múltiplas cópias de uma sequência de DNA específica. Após terminar a reação a maior parte dos *primers* e dNTP permanecem intactas, e, se não retiradas, irão interferir no sequenciamento das amostras (fig. 14). As enzimas Exonuclease I (*Exo I*) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) removem estes materiais indesejados com a adição de 1 µL de enzima (*Exo I*) em 3 µL de

PCR, correspondendo de 1 a 10 ng, e 6 μL de H_2O UltraPure Gibco[®], completando o volume pra 10 μL de material a ser purificado. A reação foi realizada em termociclador a 37^oC por 30 minutos, seguido de 80^oC por 15 minutos, para inativação da enzima.

Figura 14 - Esquema representativo da Purificação do produto de PCR.



Nota: Método de purificação de produtos de PCR que utiliza Exonuclease I (*Exo I*) para digerir excesso de *primers* e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR.

3.7.2 Sequenciamento dos Genes HA e NA

Após a purificação, as fitas de cDNA foram sequenciadas utilizando-se o kit “ABI PRISM Dye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit” (“Big Dye” - Applied Biosystems, Inc., EUA), seguindo as instruções do fabricante. Em 5 μL do produto purificado foram adicionados 1 μL (5 pmol) de *primer*, 2 μL do “Terminator ready reaction Mix, Big Dye” e 2 μL do tampão de sequenciamento (*save money* - Tris HCl 200mM [pH 9,0] e 5 mM MgCl_2). A extensão enzimática foi realizada em

termociclador Gene Amp PCR System 9700 durante 25 ciclos de 96°C por 10 segundos para a desnaturação do DNA molde, 50°C por 10 segundos para o *annealing* dos *primers* e 60°C por 4 minutos para a extensão.

O produto obtido foi purificado, visando à remoção de excesso de dideoxynucleotídeos "terminadores" presentes na reação pelo kit *X-terminator* (*Applied Biosystems Inc., EUA*) conforme instruções do fabricante. Onde, em 10 µL da reação de sequenciamento, foi acrescido 10 µL do *X-Terminator* e 55 µl de tampão da Reação (*buffer SAM'S*). O mix foi agitado por 30 minutos seguido de uma centrifugação a 1300 xg por 1 minuto e o sobrenadante foi submetido à eletroforese em polímero POP6, utilizando sequenciador automático ABI modelo 3100 (*Applied Biosystems, Inc., EUA*).

Todas as reações foram feitas em duplicatas, sendo uma das reações de sequenciamento com *primer forward* e outra para o *primer reverse*. Quando necessário repetiu-se a reação.

3.8 Análises Filogenéticas das Proteínas HA e NA

3.8.1 Processamento e análise das sequencias dos genes HA e NA

As sequencias de nucleotídeos foram analisadas, editadas, alinhadas e a árvore foi reconstruída com os programas *EditSeq* e *MegAlign* do pacote *Laser Gene vs.5.03* (*DNASTAR Inc*). As sequencias de nucleotídeos, correspondente às proteínas HA e NA foram alinhadas e analisadas independentemente. Para cada proteína analisada foi obtido como resultado a obtenção do grau de similaridade entre as sequências, calculadas par a par, o que possibilitou a identificação das sequencias de nucleotídeos idênticas. Com o intuito de otimizar as análises subsequentes, tomou-se, aleatoriamente, apenas uma amostra de cada grupo de sequências idênticas. Desta forma, apenas as sequencias que apresentaram pelo menos uma mudança no número ou posição dos nucleotídeos foram submetidas à análise de genotipagem comparando-as com amostras existentes no *GenBank*.

4 RESULTADOS

4.1 Total das amostras capturadas

Foram capturadas 37 aves nas 3 regiões de coletas de diferentes espécies, dentre elas migratórias e residentes e coletadas 69 amostras tabela 2, das quais 32 foram swab oral e 37 swabs cloacais (tabela 2). Dentre as 37 aves analisadas, doze (32,4%) apresentaram resultado positivo pela PCR para HA e NA, na qual 5 são aves migratórias (41,6%), conforme demonstrado na (tabela 3).

Tabela 2- Total de amostras testadas em diferentes espécies de aves frequentadoras das estações experimentais de Guarulhos, Iguape e Juquitiba– SP e porcentagem total de positividade de isolamento.

ESPÉCIES	MUNICÍPIOS								
	Guarulhos			Iguape			Juquitiba		
	Total	Pos.	%(+)	Total	Pos.	%(+)	Total	Pos	%(+)
<i>Cnemotricus fuscatus</i>	-	-	-	-	-	-	1	0	-
<i>Coereba flaveola</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Columbina talpacoti</i>	7	2	28,6%	1	0	-	-	-	-
<i>Elaenia flavogaster</i>	-	-	-	1	0-	-	-	-	-
<i>Elaenia mesoleuca</i>	2	2	100%	1	0	-	-	-	-
<i>Molothrus bonarienses</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Paroaria dominicana</i>	2	2	100%	-	-	-	-	-	-
<i>Picumnus temminckii</i>	1	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Ramphocelus bresilius</i>	-	-	-	1	0	-	-	-	-
<i>Sporophila caerulescens</i>	-	-	-	1	1	100%	-	-	-
<i>Sporophila lineola</i>	-	-	-	1	1	100%	-	-	-
<i>Synallaxis spixii</i>	1	0	-	1	0	-	-	-	-
<i>Tachyphonus coronatus</i>	-	-	-	-	-	-	1	0	-
<i>Tangara desmaresti</i>	-	-	-	-	-	-	2	0	-
<i>Thraupis sayaca</i>	2	0	-	-	-	-	-	-	-
<i>Thlypopsis sordida</i>	1	0	-	1	0	-	-	-	-
<i>Troglodytes aedon</i>	-	-	-	-	-	-	1	0	-
<i>Vireo olivaceus</i>	-	-	-	1	1	50%	2	2	100%
<i>Volatinia jacarina</i>	-	-	-	1	0	-	-	-	-
<i>Zonotrichia capensis</i>	-	-	-	1	0	-	1	0	-

Tabela 3 - Relação das amostras coletadas de espécies de aves capturadas em diferentes áreas e tipos de habitat, com resultados positivos para o vírus da Influenza A.

Amostras	Nome científico	Nome popular Brasileira	Area/Captura	Habitat	Data/Coleta
LE6712	<i>Elaenia mesoleuca</i> ^{MI}	Guaracavas	Guarulhos	Mata.	04/11/97
LE6715	<i>Elaenia mesoleuca</i> ^{MI}	Guaracavas	Guarulhos	Mata.	04/11/97
LE 6744	<i>Sporophila lineola</i> ^R	Bigodinho	Iguape	Capoeira	12/11/97
LE 6745	<i>Sporophila caerulescens</i> ^R	Coleirinha	Iguape	Capoeira	12/11/97
LE 6751	<i>Vireo olivaceus</i> ^{MI}	Juruviara	Iguape	Capoeira	12/11/97
LE6780	<i>Columbina talpacoti</i> ^R	rolinha caldo de feijão	Guarulhos	Mata	12/11/97
LE 6781	<i>Columbina talpacoti</i> ^R	rolinha caldo de feijão	Guarulhos	Mata	12/11/97
LE6782	<i>Paroaria dominicana</i> ^R	galo de campina	Guarulhos	Mata	12/11/97
LE 6783	<i>Paroaria dominicana</i> ^R	galo de campina	Guarulhos	Mata	12/11/97
LE 6784	<i>Columbina talpacoti</i> ^R	rolinha caldo de feijão	Guarulhos	Mata	12/11/97
LE 6841	<i>Vireo olivaceus</i> ^{MI}	Juruviara	Juquitiba	Mata	28/01/98
LE 6844	<i>Vireo olivaceus</i> ^{MI}	Juruviara	Juquitiba	Mata	28/01/98

Nota: MI – Migratória Intercontinental; R – Residente

Fonte: Baseado em Pereira et al. (1998).

4.2 Inibição de hemaglutinação para caracterização de subtipos de influenza A

As amostras testadas apresentaram títulos Inibição de Hemaglutinação maior que 1:20 para os respectivos soros imunes e antígenos padrões dos subtipos A/Hong Kong/8/68 (H3N2), A/equine/Miami/65 (H3N8), A/duck/Ukraine/63 (H3N8) que estão representada na tabela 4. Os Soros imunes e antígenos dos demais subtipos apresentaram títulos Inibidores de Hemaglutinação menor que 1:20 considerado amostras negativa ou não apresentaram títulos inibidores de hemaglutinação.

Tabela 4 - Identificação Sorológica pelo teste de Inibição de Hemaglutinação (HI) das amostras de aves em comparação aos anti soros e antígenos de Influenza A/Hong Kong/8/68 (H3N2), A/equine/Miami/65 (H3N8) e A/duck/Ukraine/63 (H3N8) como controle negativo Influenza tipo B/Lee/40.

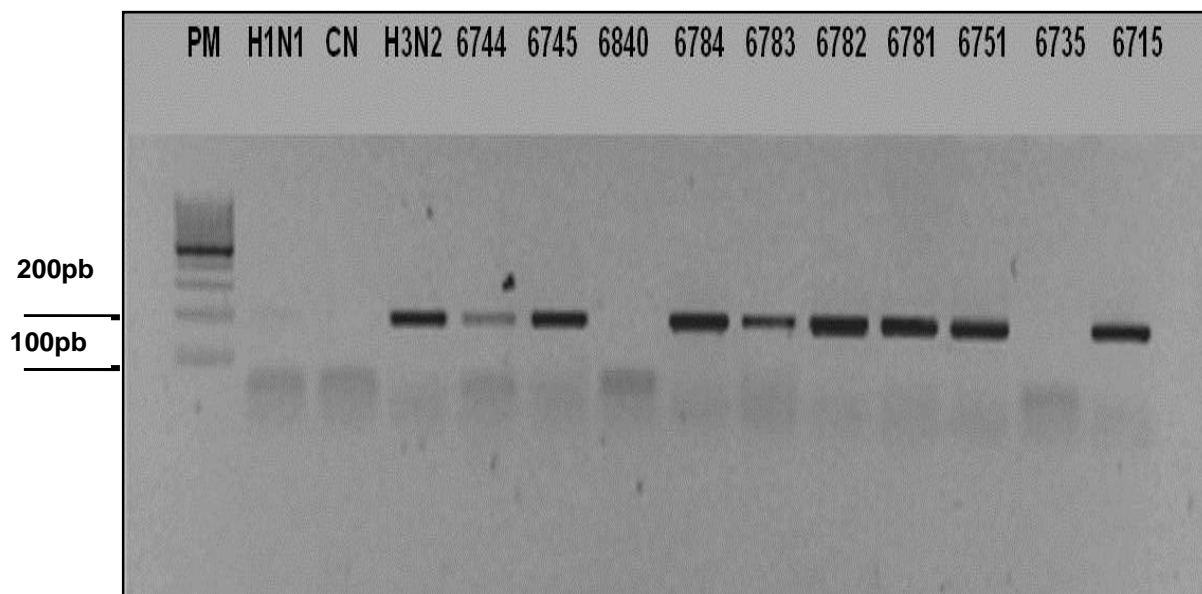
ANTIGENO (4UHA) SORO(DIL1:20)	A/HongKong/8 /68 (H3N2)	A/equine/Mia mi/65(H3N8)	A/duck/Ukan e/63 (H3N8)	B/Lee/ 40
LE6712 (<i>Elaenia mesoleuca</i>)	320	40	40	<20
LE6715 (<i>Elaenia mesoleuca</i>)	320	40	40	<20
LE6744(<i>Sporophila lineola</i>)	1024	80	40	<20
LE6745(<i>Sporophila caerulescen</i>)	320	40	20	<20
LE6751(<i>Vireo olivaceus</i>)	320	40	20	<20
LE6780(<i>Columbina talpacoti</i>)	320	40	40	<20
LE6781(<i>Columbina talpacoti</i>)	320	80	80	<20
LE6782(<i>Paroaria dominicana</i>)	640	40	40	<20
LE6783 (<i>Paroaria dominicana</i>)	320	40	40	<20
LE6784(<i>Columbina talpacoti</i>)	160	40	20	<20
LE6841 (<i>Vireo olivaceus</i>)	320	40	40	<20
LE6844 (<i>Vireo olivaceus</i>)	160	40	80	<20
A/HongKong/8/68(H3N2)	1024	80	40	<20
A/equine/Miami/65(H3N8)	160	640	80	<20
A/duck/Ukraine/63(H3N8)	80	160	320	<20
B/Lee/40	<20	<20	<20	320

4.3 Caracterização molecular das amostras de aves para tipagem e subtipagem das amostras positivas.

4.3.1 PCR de triagem de Influenza A pela NS1

Das 14 amostras testadas com os primers da tabela 1, 12 amostras apresentaram produto de amplificação. A figura 15 demonstra a amplificação de 10 das 14 amostras testadas.

Figura 15- Visualização do produto de PCR da triagem de AIV NS1.



Nota: Corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo de 2 subtipos de Flu A (H1N1 e H3N2), um controle negativo e 10 amostras de aves (LE6744, LE6745, LE6840, LE6784, LE6783, LE6782, LE6781, LE6751, LE6735, LE6715) realizado para triagem de positividade. São consideradas positivas as amostras que amplificaram com os primers FluA-F1- Fam e FluA-R1, com obtenção de um fragmento de 192pb.

4.3.2 Tipagem pela Amplificação das proteínas HA e NA

Das 12 amostras que apresentaram resultado positivo para Influenza do tipo A isolada de aves na seção 4.3.1, todas as amostras apresentaram resultados positivos para os subtipos H3N2, como indicado na tabela 5.

De acordo com as normas do VI Comitê Internacional de Nomenclatura realizado em 1980 para a caracterização do vírus da Influenza A em animais estão demonstrado na tabela 6.

Tabela 5- Resultado da triagem (NS1) e tipagem (HA e NA).

Amostras	Tipagem	Subtipagem			
		H1	H3	N1	N2
6712	+	-	+	-	+
6715	+	-	+	-	+
6735	-	NR	NR	NR	NR
6744	+	-	+	-	+
6745	+	-	+	-	+
6751	+	-	+	-	+
6780	+	-	+	-	+
6781	+	-	+	--	+
6782	+	-	+	-	+
6783	+	-	+	-	+
6784	+	-	+	--	+
6840	-	NR	NR	NR	NR
6841	+	-	+	-	+
6844	+	-	+	-	+
C+H3 Johnb*	+	-	+	-	+

Legenda- NR – Não Realizado; Johannesburg*- cepa controle de Johannesburg; H1- Hemaglutinina subtipo 1 e H3- Hemaglutinina subtipo 3; N1 – Neuraminidase subtipo1 e N2 – Neuraminidase subtipo 2; (+) - amostra positiva; (-) – amostra negativa.

Tabela 6- Denominação das amostras positivas de acordo o quarto comitê internacional de nomenclatura realizado em 1980.

Amostras	Nomenclatura
6712	<i>A/Elaenia mesoleuca</i> /PET/LE6712/97 (H3N2)
6715	<i>A/Elaenia mesoleuca</i> /PET/LE6715/97 (H3N2)
6744	<i>A/Sporophila lineola</i> /Iguape/LE6744/97 (H3N2),
6745	<i>A/Sporophila caerulescen</i> /Iguape/LE6745/97(H3N2),
6751	<i>A/Vireo olivaceus</i> /Iguape/LE6751/97 (H3N2),
6780	<i>A/Columbina talpacoti</i> /PET/LE6780/97 (H3N2),
6781	<i>A/Columbina talpacoti</i> /PET/LE6781/97 (H3N2),
6782	<i>A/Paroaria dominicana</i> /PET/LE6782/97 (H3N2),
6783	<i>A/Paroaria dominicana</i> /PET/LE6783/97 (H3N2),
6784	<i>A/Columbina talpacoti</i> /PET/LE6784/97 (H3N2),
6841	<i>A/Vireo olivaceus</i> /Juquitiba/LE6841/98(H3N2),
6844	<i>A/Vireo olivaceus</i> /Iguape/LE6844/98 (H3N2),

Legenda- PET – Parque Ecológico do Tietê

4.4 Análise da variabilidade genética dos genes HA e NA

4.4.1 Construção das árvores filogenéticas

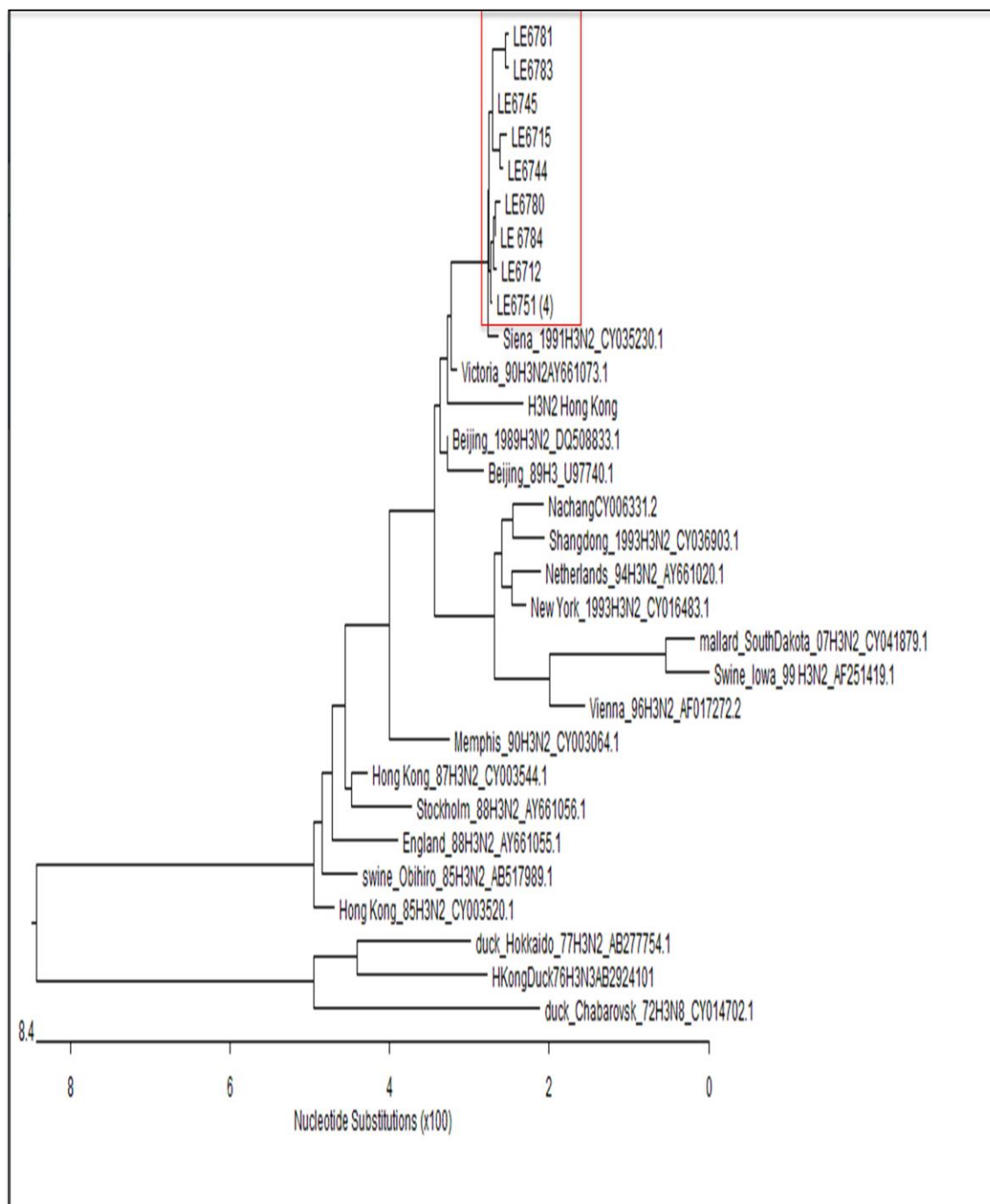
As sequências nucleotídicas obtidas pela amplificação genes codificadores das proteínas NA e HA, foram comparadas separadamente pelo método de *Clustal W*, conforme descrito na seção 3.8.1, com 21 sequências obtidas no *GenBank*. Das sequências que foram 100% iguais, tomou-se apenas uma amostra como representante para tornar melhor a reconstrução filogenética (tabela 7).

Tabela 7 - Conjunto de amostras idênticas obtidas pelo alinhamento de nucleotídeos das sequências brasileiras, utilizadas na análise filogenética pela proteína HA.

CONJUNTO DE SEQUENCIAS IDÊNTICAS		
Representantes	Representadas HÁ	Representadas NA
LE6712	-	LE – 6782,6744, 6745, 6751
LE6841	-	LE – 6784, 6783, 6781, 6780, 6745, 6744, 6715, 6844
LE6751	6782, 6841, 6844	

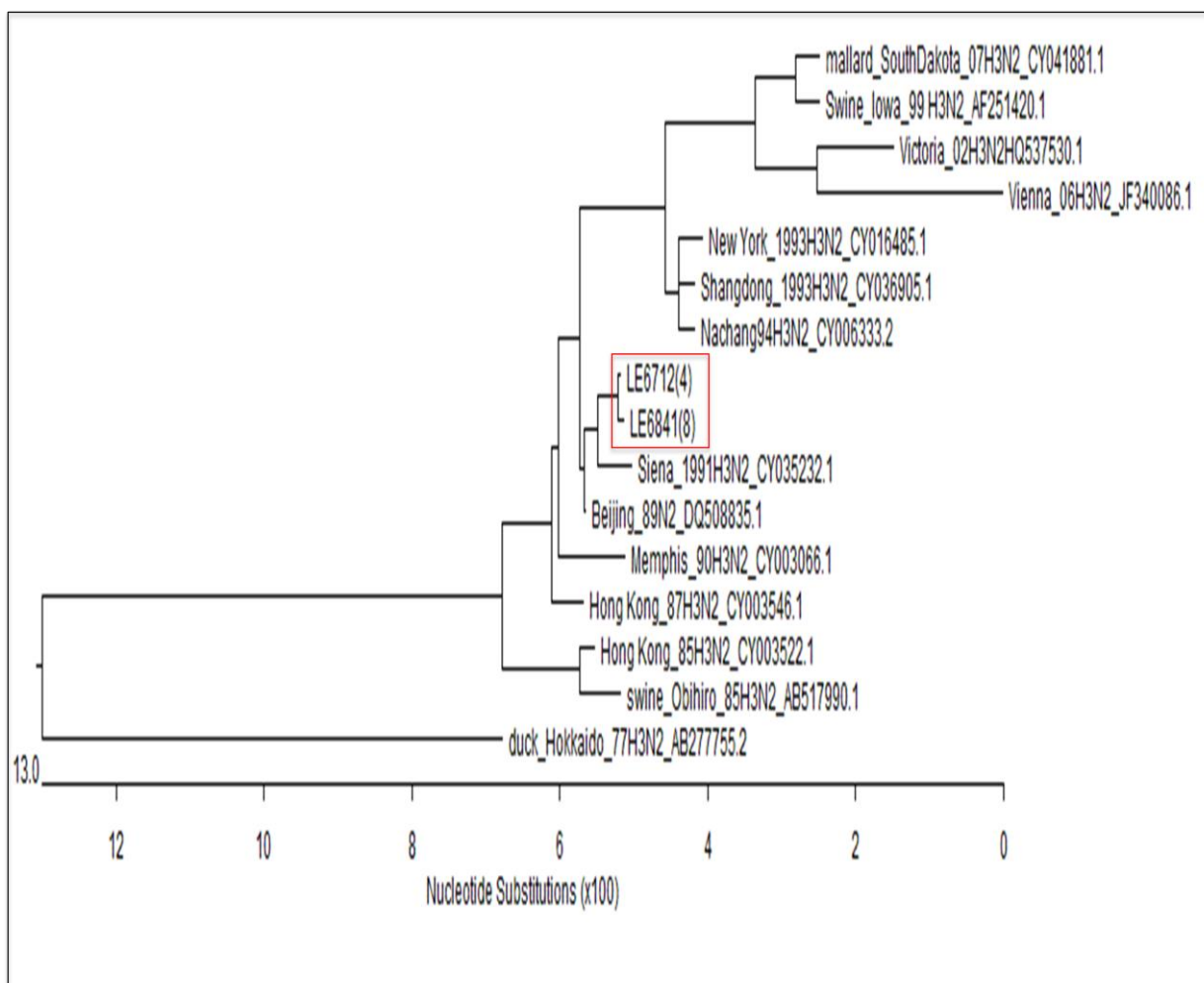
A topologia da árvore obtida pelo método de *CLUSTAL W*, a partir da análise de nucleotídeo da proteína HA está representada na figura 16 e a NA está representada na figura 17.

Figura 16- Topologia da árvore obtida do gene de HA.



Nota: Análise filogenética do AIV obtida pelo método de Clustal W. As 9 amostras brasileiras estão representadas pelas letras LE e dentro do quadro vermelho. Sequência completa do gene da proteína HA isoladas originalmente no Brasil e comparadas com sequências disponíveis no GeneBank foram utilizadas para construir a árvore filogenética. (os acessos CY035230; CY00633; CY036903; CY0164483; CY003064; CY041879; CY003544; CY003525; CY014702; AY661073; AY661020; AY661056; AY661055; AF017272; AF251419; AB2924101; AB517989; AB277754; DQ508833; U97740; HonkKong_H3N2)

Figura 17- Topologia da árvore do gene de NA



Nota: Análise filogenética do IA obtida pelo método de Clustal W. As 2 amostras brasileiras estão representadas pelas letras LE e dentro do quadro vermelho. Sequência parcial do gene da proteína NA isoladas originalmente no Brasil e comparadas com 14 sequências disponíveis no GeneBank foram utilizadas para construir a árvore filogenética (os acessos: CY041881; CY016485; CY036905; CY006333; CY035232; CY003066; CY003546; CY003522; AB517990; AB277755; AF251420; HQ537530; DQ508835; JF340086)

4.4.2 Análise da variabilidade de nucleotídeos inter e intra-grupo da HA e NA

Com o alinhamento pelo método de *Clustal W* do programa de *DNAstar*, entre as sequências nucleotídicas correspondente a 1687 pb que codificam a proteína HA e 900 pb que codificam a NA, foi possível verificar que não houve inserções ou deleções nestas regiões, das amostras sequenciadas.

A menor similaridade genética na HA foi de 98.6% entre as nossas amostras representativas: LE6781 com a LE6751 (4). Quando comparadas com as amostras

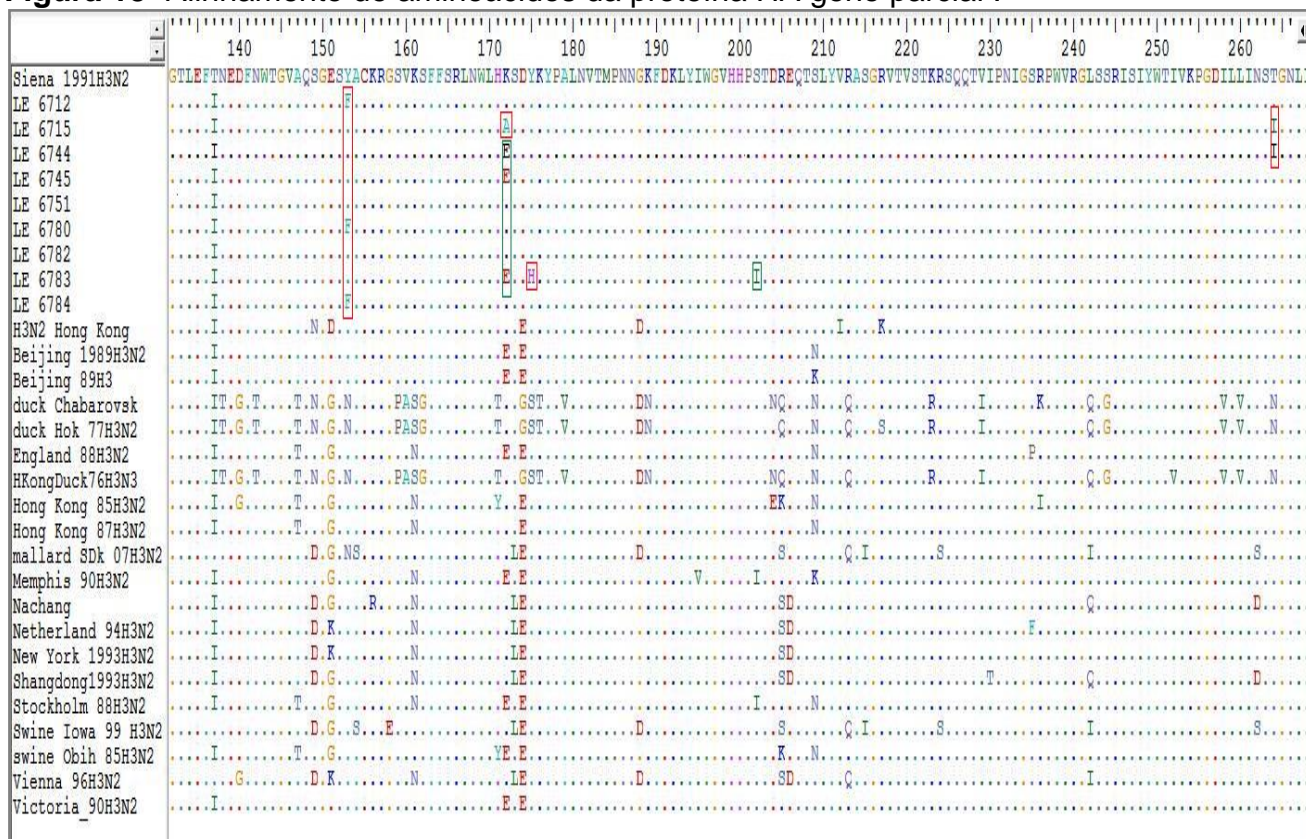
obtidas do *GenBank* observamos a maior similaridade de 99.8% entre as amostras LE6751 com a *GenBank* Siena_1991 (H3N2).

A menor similaridade genética na NA foi de 99.8% entre nossas amostras representativas: 6712 (4) e 6841 (8). Quando comparadas com as amostras obtidas do *GenBank* observamos a maior similaridade de 99.1% com a amostra do *GenBank* Siena_1991 (H3N2).

4.4.3 Análise da variabilidade de aminoácidos da Hemaglutinina (HA)

Pelo alinhamento dos aminoácidos gerados pelo sequenciamento do gene da Hemaglutinina, foram encontradas 04 mutações (Y153F, K172A, K175A, T204I) em 6 diferentes isolados, que quando comparadas com sequências do *GenBank* foram exclusivas de nossas amostras. Outras 07 mutações estavam presentes também em outros representantes do *GenBank* em relação a amostra padrão Siena.(figura 18).

Figura 18- Alinhamento de aminoácidos da proteína HA gene parcial .

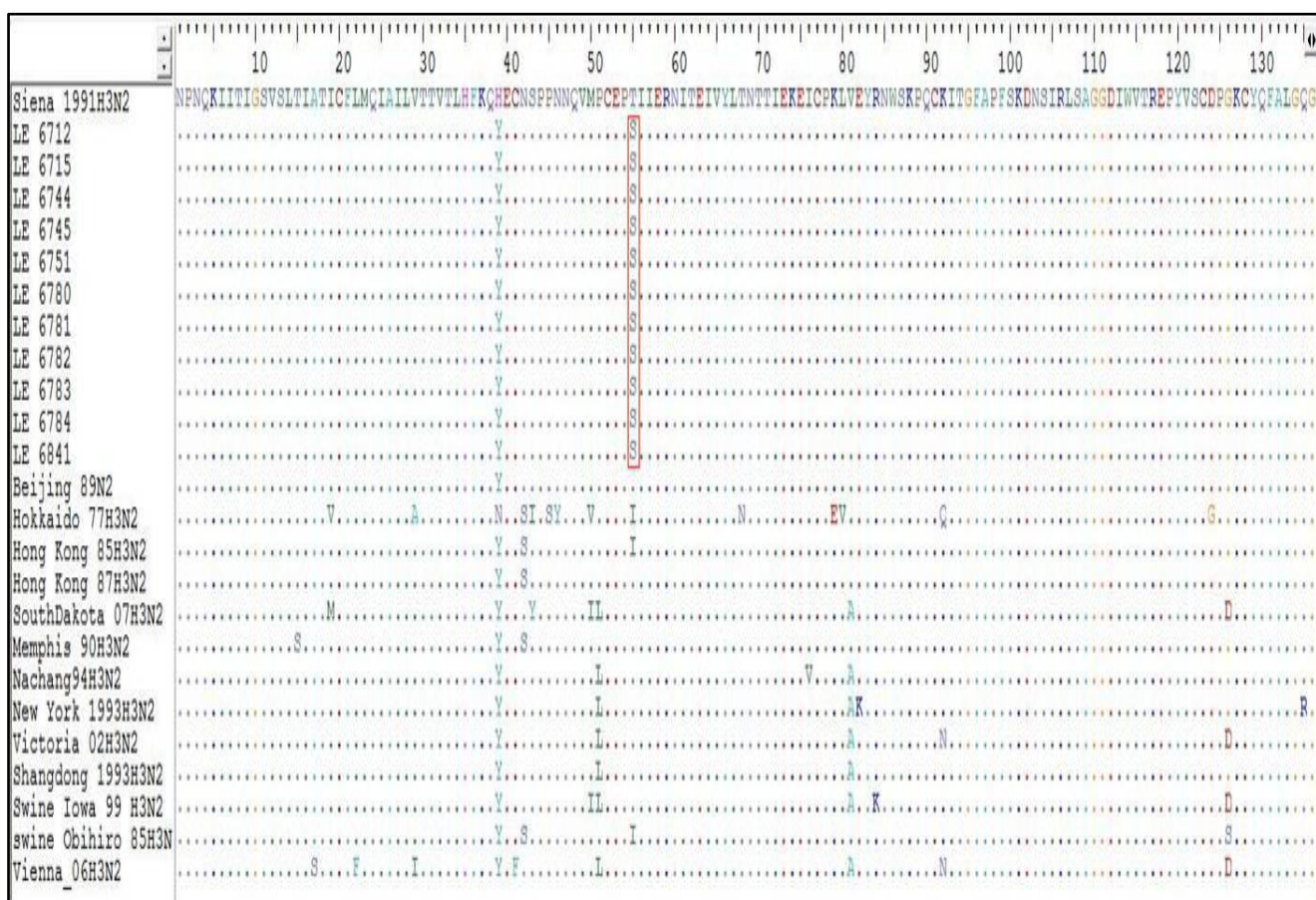


Nota: A figura demonstra a presença de 04 mutações que quando comparadas com sequências do GeneBank foram exclusivas de nossas amostras (box vermelho) e 03 de 07 mutações que estavam presentes em nossas amostras, mas também em outros representantes do GeneBank.

4.4.4 Análise da variabilidade de aminoácidos da Neuraminidase.

Através do alinhamento de aminoácidos gerados a partir do sequenciamento nucleotídeos do gene NA, comparados à cepa Siena (H3N2 1991), foram notadas uma mutação exclusiva em todos os isolados. Quando comparadas com sequências do GenBank 2 mutações foram exclusivas de nossas amostras, e 7 mutações presentes em outros representantes do GenBank. Quando estes nucleotídeos foram alinhados e traduzidos em aminoácidos e comparados com sequências do GenBank representantes do Influenza Vírus, foi observado que a maioria das mutações foram silenciosas, assim como no caso de HA (figura 19)

Figura 19- Alinhamento de aminoácidos da Proteína NA, gene parcial.



Nota: Indica as 02 mutações (em todos os isolados), comparadas com sequências do GenBank mutações foram exclusivas de nossas amostras, e 07 mutações presentes em outros representantes do GenBank.

5 DISCUSSÃO

Nosso estudo teve como objetivo caracterizar por métodos moleculares, as amostras de vírus da influenza A isoladas em aves silvestres do tipo passeriformes da região de mata atlântica residual, localizadas no Vale do Ribeira (municípios de Iguape e Juquitiba) com proximidades de região rural e no Parque Ecológico do Tietê, localizado em área urbana da cidade de São Paulo. Esse trabalho iniciou-se por ocasião de nossa Dissertação de Mestrado no ano de 1999. Para tanto, as aves foram capturadas em rede “mist net”, anilhadas, classificadas e delas foram coletadas amostras de swabs oral cloacal e sangue. As aves foram liberadas para as matas após o procedimento (seguindo padrões do IBAMA).

Os isolamentos do vírus da Influenza A foram verificados nas 14 amostras de aves residentes e nas cinco amostras de aves migratórias. O cultivo viral foi realizado tanto em ovos embrionados de galinha (SPF) como em culturas celulares de linhagem MDCK (rim de cão). Para confirmação do crescimento do vírus da Influenza, tanto em ovo embrionado como em cultura celular, foi aplicado o Teste de Hemaglutinação utilizando hemácias de galinha na identificação do vírus da Influenza A. Nas culturas suspeitas de Efeito Citopático outro teste empregado foi o de Hemoadsorção com hemácias de cobaia. Também foi feita a Microscopia Eletrônica para a caracterização das cepas isoladas de culturas celulares e daquelas obtidas em ovos embrionados de galinha. De todas as metodologias laboratoriais utilizadas, a visualização por microscopia eletrônica da partícula viral da amostra LE6712, aconteceu antes da detecção do Teste Hemaglutinação (KAWAMOTO et al., 2005).

A caracterização antigênica dos vírus da Influenza A dos 14 isolados foi realizada através do Teste Rápido para o diagnóstico de Influenza A com anticorpos monoclonais para detectar a nucleoproteína (NP) (kit Roche). Esse teste, além de confirmar a positividade para Influenza A nos nossos isolados, demonstrou sensibilidade e menor tempo para o diagnóstico das amostras positivas antes de apresentar título hemaglutinante (KAWAMOTO et al., 2005).

As duas amostras LE6712(H3N2) e LE 6744(H3N2) confirmadas pelos Testes Sorológicos de Hemaglutinação e Inibição de Hemaglutinação(WHO), mostraram ser patogênicas quando inoculadas em ovos embrionados (9 dias), com morte dos embriões e disseminação dos vírus em todos os órgãos. Foi observado que a taxa de mortalidade, lesões e aumento de título Hemaglutinante evidenciou-

se após a terceira passagem em ovos embrionados, indicando a adaptação do vírus de aves nas células embrionadas de ovos de galinha SPF (livre de patógenos específicos). Tais dados corroboram com o trabalho de CHACÓN et al., 2007 que demonstrou a possibilidade do vírus de Influenza A isolados de aves selvagem se adaptarem para frango comercial, podendo esse fenômeno acontecer também em condições naturais.

A subtipagem das amostras positivas de influenza A isoladas das 14 aves silvestres de nosso estudo foi obtida pela técnica de Inibição de Hemaglutinação segundo o manual preconizado pela WHO com respectivos soros e antígenos padrões. Foram utilizados 19 subtipos do vírus da Influenza A, gentilmente cedidos pelo Dr. Robert Webster do centro de referência de Influenza do St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee, USA. Essas caracterizações foram efetuadas no laboratório de segurança NB3+ do Instituto de Ciências Biomédicas com o assessoramento do Dr. David Walker, pesquisador sênior do laboratório do Dr. Webster e na época responsável pelo monitoramento da gripe aviária em todo o mundo. Nossas amostras apresentaram, pela reação de inibição da hemaglutinação, títulos maiores ou iguais a 160 para o vírus A/Hong Kong/8/68 (H3N2), o que conferiu a tipificação dos nossos isolados como Influenza A A/wildbird/SãoPaulo/99 (H3N2).

A tipificação antigênica do nosso isolado H3N2 confirmou, das 14 amostras com sorologia positivas, 12 amostras foram positivas por métodos moleculares utilizando a reação de RT-PCR para dos subtipos de Influenza (Flu) A (H1 e H3; N1 e N2). Os primers e o protocolo utilizados foram gentilmente cedidos pelo Dr. Martin Schutten da Erasmus Medical Center, Department of Virology, Rotterdam, Netherlands. Esse método de subtipagem molecular por RT-PCR foi validado pela equipe da Erasmus University durante a pandemia de A/H1N1 pandêmico em 2009, e fazem parte da rotina de diagnóstico molecular de vírus respiratórios do laboratório de virologia clínica e molecular do ICBII.

O achado do subtipo H3N2 em aves silvestres dos nossos isolados, não nos causou surpresa, uma vez que esses resultados vieram corroborar com os achados de Sharp et al., 1993 que demonstraram que somente três dos quinze subtipos de hemaglutinina (H3, H4, H6) e três dos nove subtipos de neuraminidase (N2, N6, N8) são constantemente achados em aves silvestres, sendo os outros subtipos H13, H14, H15 e N5, N7 e N9 menos frequentemente encontrados em aves silvestres. Um

monitoramento de aves migratórias na América do Norte, feito por Krauss et al.(2004), pesquisando 13.466 patos silvestres migratórios durante o período de 26 anos (1976 a 2001) e maçaricos migratórios da ordem Charadriiforme no período de 16 anos (1985 a 2000), demonstrou uma porcentagem de positividade para o subtipo H3 de hemaglutinina de 27,1% e para o subtipo N2 de neuraminidase de 23,5%. Os quais são considerados os subtipos mais comuns de Influenza A circulantes em aves aquáticas migratórias (patos silvestres e maçaricos) na América do Norte. Essas duas ordens de aves migratórias são as mais frequentes encontradas na rota de migração anual do hemisfério norte para o hemisfério sul.

No ano de 2003 o Serviço de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde realizou um estudo de monitoramento para pesquisa dos vírus da Influenza A e vírus da Doença do Oeste do Nilo em aves silvestres migratórias e residentes, no Nordeste do Brasil, no Município de Galinhos-RN entre 22 de Abril e 3 de maio de 2003 e no Sul do país, no parque Nacional da Lagoa do Peixe de 16 a 27 de novembro de 2003. Durante o período de estudo foram amostrados 711 aves de 23 espécies diferentes na Região Nordeste nas quais detectou-se o subtipo H3 em 13 espécies de aves distintas. Na Região Sul foram amostradas 172 aves de 19 espécies diferentes, sendo que o subtipo H4 foi encontrado em 2 duas espécies distintas, igualmente ao H2 (ARAÚJO et al., 2004^a e 2004b). Tais dados corroboram com os nossos achados, mostrando uma maior frequência do subtipo H3 em aves silvestres residentes e migratórias no Brasil.

As amostras do vírus A/wildbird/SãoPaulo/79(H3N2) foram caracterizadas sorologicamente em 12 amostras de aves pertencentes a cinco diferentes tipos de espécies silvestres residentes e migratórias no Estado de São Paulo, sendo elas: *Elaenia mesoleuca* (2), *Sporophila lineola* (1), *Sporophila caerulescens* (1), *Columbina talpacoti* (3) *Vireo olivaceus* (3), *Paroaria dominicana* (2). Elas são frequentadoras das estações experimentais de campo, localizadas no Parque Ecológico do Tietê - Guarulhos, Iguape e Juquitiba – SP. As coletas foram feitas entre os meses de novembro/97 a janeiro/98, época coincidente com a migração das aves do hemisfério norte para o hemisfério sul. Dentre essas aves, duas espécies são migratórias *Elaenia mesoleuca* e *Vireo olivaceus* e de ampla distribuição geográfica nas Américas, levantando uma hipótese de sua possível participação na disseminação do vírus da Influenza A de um hemisfério a outro. A presença desses vírus em diferentes espécies de aves pode ainda estar contribuindo para a

manutenção de um ciclo de transmissão interespécies desse agente, abrangendo inclusive animais domésticos (PEREIRA et al,1999).

Apesar de serem considerados de baixa patogenicidade, vários estudos estão confirmando a circulação de Influenza A H3N2 nas populações de aves domésticas. Visto que esse subtipo é capaz de infectar humanos, e com o surgimento de novos recombinantes de vírus H3N2 com incorporação de um gene do vírus H5N1, trazem a tona novas preocupações sobre a geração de novos vírus que possam infectar populações humanas suscetíveis (GUAN Y et al., 2010; KANG et al., 2009; WEI et al., 2008). Em 2005 um novo recombinante com três rearranjos genômicos de H3N2 denominado de trH3N2 foi isolado de suínos e perus no Canadá e posteriormente esse novo recombinante trH3N2 foi isolado em humanos em 2006, em vison em 2007 em codornas em 2008 e novamente em suínos em 2009, no mesmo país, sugerindo uma estabilidade da linhagem trH3N2 em suínos e uma evidência de transmissão interespécie para perus e codornas (NFON et al, 2011).

Em 2011 um novo recombinante do vírus da Influenza A H3N2, denominado de A/Duck/Guangdong/W12/2011(H3N2) foi isolado de aves em um mercado de comércio de aves vivas no sul da China, evidenciando ser, por caracterização molecular, um novo recombinante entre os subtipos H3N2 com os subtipos H6 e H7 do vírus da Influenza aviária (JIN TIAN et al., 2012). Em um estudo recente, a amostra de vírus da Influenza A A/duck/Shanghai/C84/2008(H3N2) isolado em um mercado de comercialização de aves vivas em Shanghai, na região leste da China, foi caracterizado por métodos moleculares utilizando o sequenciamento completo do genoma viral, como sendo um novo recombinante formado por múltiplos rearranjos de genes do vírus da Influenza Aviária entre os subtipos H3N2, H4N6, H6N2 e H9N2 (TENG et al., 2012).

Devemos aditar ainda a utilização da bioinformática para a análise de sequências virais. As ferramentas citadas foram extremamente importantes para avaliar os dados obtidos dos produtos de sequenciamento das amostras positivas que nos levaram ao conhecimento da evolução dos vírus pela análise filogenética do gene Hemaglutinina e Neuraminidase das 12 amostras de Influenza A (H3N2) que foram agrupados no mesmo clado e foram geneticamente semelhantes aos de Siena (1991).

As análises de aminoácidos das proteínas HA e NA demonstraram a ocorrência de mutações sinônimas e não sinônimas nas nossas amostras quando comparadas com amostras do Gene Bank. Apesar do subtipo de Influenza H3N2 ser considerado de baixa patogenicidade, as amostras LE6712 e LE6744 foram caracterizadas como sendo patogênicas quando inoculadas em ovos embrionados e nelas foram detectadas duas mutações exclusivas, Y153F e T264I nas suas proteínas de Neuraminidase. Nas Hemaglutininas foram detectadas 4 mutações exclusivas de (Y153F, K172A, K175H e T264I) em diferentes isolados de nossas amostras.

O sequenciamento do produto PCR dos genes da Hemaglutinina e Neuraminidase através da análise filogenética de estudo comparativo, viabilizou avaliar a similaridade dos subtipos das regiões isoladas e com circulantes em outro continente. Nossas amostras foram agrupadas com outras vindas da Europa, Ásia e América do Norte, confirmando com os achados de Sharp et al.(1993) que obtiveram em seus estudos amostras similares também de diferentes continentes.

Os dados provenientes de nosso trabalho ressaltam a necessidade de um estudo mais acurado da epidemiologia da Influenza A, havendo a possibilidade de se definir quais as espécies reservatórias e veiculadoras que estariam participando em vida silvestre nas regiões de Mata Atlântica nas cercanias de áreas urbanas de alta densidade como é o foco de nosso estudo na cidade de São Paulo. A presença de mamíferos nas regiões estudadas, pode estar favorecendo o surgimento de cepas emergentes do subtipo H3N2, que possivelmente, estariam atuando na transmissão do vírus da influenza A (WEBSTER et al 1997; YASSINE HM,et al, 2007; CHEN,.LM et al, 2008; ZHOU H et al; 2011).

6- CONCLUSÃO

- As amostras colhidas das aves residentes e migratórias das estações experimentais de campo de Guarulhos, Iguape e Juquitiba, apresentaram uma positividade de 18,8% para o isolamento do vírus da Influenza A subtipo H3N2.

- A detecção do vírus da Influenza A subtipo H3N2 nas espécies de aves migratórias *Vireo olivaceus* e *Elaenia mesoleuca* levanta a hipótese do carreamento do vírus da Influenza A de um hemisfério para outro. O resultado deste estudo mostra que nossos pássaros poderiam ser responsáveis pela manutenção e disseminação do subtipo do vírus da gripe H3N2 na área estudada.

- A similaridade genética entre nossas amostras quando comparado com as amostras obtidas de *GeneBank* mostrou que nossas amostras são semelhantes as cepas Victoria (1990), Siena (1991) e Benjin (1989).

- Pelo sequenciamento dos genes HA e NA quando alinhadas à cepa Siena (1991) e comparadas com outras amostras de diferentes continentes, foram encontradas 04 mutações na HA e um na NA exclusivas de nossas amostras.

- Nossas Amostras quando analisadas a proteína NA, não apresentaram mutações nos aminoácidos E119V e N274Y que conferem resistência aos inibidores da Neuminidase do subtipo N2.

REFERÊNCIAS*

ALEXANDER, D. J. A review of avian influenza in different bird species. **Vet. Microbiol.**, v. 22, p. 3-13, 2000.

ALEXANDER, D. J. Report on avian influenza in the Eastern Hemisphere during 1997 - 2002. **Avian Dis.**, v. 47, p. 792-797, 2003.

ANRAKU, M. M. C.; PINTO, A. A.; GODO, C. V.; DE FRANCO, D. C.; IPÓLITO, O. Influenza tipo A em galinhas: inquérito sorológico através da inibição da hemaglutinação e da imunodifusão. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 18, p. 6-9, 1976.

ARANKU, M. N. O.; FARIA, W. de CARMO.; TAKEYAMA, D. C. Influenza aviária em aves silvestres brasileiras. I. Inquérito sorológico através da imunodifusão. **Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo**, v. 13, p. 292-296, 1971.

ARAUJO, F. A. A. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do parque nacional da Lagora do Peixe / RS para detecção do vírus da febre do Nilo Ocidental e outros. **Boletim Eletrônico**, n. 5, p. 7, 2004a. Disponível em: <http://dtr2001.sade.gov.br/svs/pub/boletim_eletronico_epi/boletim>. Acesso em: 10 abr. 2013.

ARAUJO, F. A. A. Serological survey in migratory resident birds of Galinhos/Rio Grande do Norte for detection of West Nile and other viruses. **Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), Brasil**, v. 4, n. 2, 2004b. Disponível em: <http://dtr2001.sade.gov.br/svs/pub/boletim_eletronico_epi/boletim>. Acesso em: 30 jan. 2013.

BANKS, J.; SPEIDEL, E.; ALEXANDER, J. D. Characterization of Avian Influenza A Virus Isolated from a Human is an Intermediated Host Necessary for the Emergence of Pandemic Viruses? **Arch. Virol.**, v. 143, p. 781–787, 1998.

BARBOSA, C. A.; LUIZ, O. M.; GUSMÃO, P. N.; COUCEIRO, S. S. N. J. Analysis of viral and cellular parameters which affect the fusion process of Influenza viruse. **Braz. J. Med. Res.**, v. 30, p. 1415-1420, 1997.

BECKER, W. B. The isolation classification of tern virus: influenza virus A/tern/South/Africa/1961. **J. Hyg. Camb.**, v. 64, p. 309-320, 1966.

BECKFORD, B. J. Buiding awareness of the avian flu outbreak and its symptoms. **Nurs. Times**, v. 100, p. 28–29, 2004.

BELSHE, R. B. Influenza as zoonosis: howlikely is a pandemic? **Lancet**, v. 35, p. 406-461, 1998.

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

BIERREGAARD R. O.; HAFT M. C.; PETERMAN P.; SMITH J.; WHITTAKER WILSON S. V. The Status North American Migrants in Central Amazonian Brazil. **The Condor**, v. 94, p. 608–621, 1992.

BLAAS, D.; PATZELT, E.; KUECHLER, E. Cap-recognizing protein of influenza virus. **Virology**, v. 116, p. 339-348, 1982.

BROWN, I. H.; LUDWIG, S.; OLSEN, C. W.; HANNOUN, C.; SCHOLTISSEK, C.; HINSHAW, V. S.; HARRIS, P. A.; MCCAULEY, J. W.; STRONG, I.; ALEXANDER, D. J. Antigenic and genetic analyses of H1N1 influenza A viruses from European pigs. **J. Gen. Virol.**, v. 78, p. 553-562, 1997.

BULLOUGH, P. A.; HUGHSON, F. M.; SKEHEL, J. J.; WILEY, V. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. **Nature**, v. 71, p. 37-43, 1994.

CALLAN, R. J.; EARLY, G.; KIDA, H.; HINSHAW, V. S. The appearance of H3 influenza viruses in seals. **J. Gen. Virol.**, v. 76, p. 199-203, 1995.

CAMERON, K. R.; GREGORY, V.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; HAY, A. J.; LIN, Y. P. H9N2 subtype influenza A viruses in poultry in Pakistan are closely related to the H9N2 viruses responsible for human infection in Hong Kong. **Virology**, v. 278, p. 36-41, 2000.

CAPPUCCI, D. T.; JOHNSON, D. C.; BRUGH, M.; SMITH, T. M.; JACKSON, C. F.; PEARSON, J. E.; SENNE, D. A. Isolation of avian subtype H5N2 from eggs during a natural outbreak. **Avian Dis.**, v. 29, p.1195-1200, 1985.

CAPUA, I.; ALEXANDER, D. J. Avian influenza and human health. **Acta Trop.**, v. 83, p. 1-6, 2002.

CAPUA, I.; MARANGON, S.; DALLA, P. M.; TERREGINO, C.; CATTOLI, G. Avian influenza in Italy 1997-2001. **Avian Dis.**, v. 47, p. 839-843, 2003.

CHACÓN, J. L. V.; KAWAMOTO, A. H. N.; DURIGON, E. L.; SAINDENBERG, A. B. S.; MARTINS, L. M.; MIZUMA, M. Y.; PEDROSO, A. C.; FERREIRA, A. J. Pathogenicity in chicken embryo of influenza viruses isolated from wild and migrating birds in Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 17., 2007, Búzios, RJ. **Resumos...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Virologia, 2007. p. 10.

CHAN, P. K. Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. **Clin. Infect Dis.**, v. 34, p. 58-64, 2002.

CHEN, L. M.; DAVIS, C. T.; ZHOU, H.; COX, N. J.; DONIS, R. O. Genetic compatibility and virulence of reassortants derived from contemporary avian H5N1 and human H3N2 influenza A viruses. **PLOS Pathog.**, v. 23, p. 1000-1072, 2008.

CHEN, W.; CALVO, P. A.; MALIDE, D.; GIBBS, J.; SCHUBERT, U.; BACIK, I.; BASTA, S.; O'NEILL, R.; SCHICKLI, J.; PALESE, P.; HENKLEIN, P.; BENNINK, J.

R.; YEWDELL, J. W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. **Nat. Med.**, v. 7, p. 1306–1312, 2001.

CLAAS, E. C.; OSTERHAUS, A. D.; VAN-BEE, R.; DE-JONG, J. C., RIMMELZWAAN, G. F.; SENNE, D. A.; KRAUSS, S.; SHORTRIDGE, K. F.; WEBSTER, R. G. Human Influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. **Lancet**, v. 351, p. 472-477, 1998.

COIMBRA, S. V. M.; LUIZ, O. M.; CABRAL, C. M.; COUCEIRO, S. S. N. J. The role of antigenically different virus neuraminidase as structures implicated in receptor binding processes. **Braz. J. Med. Biol. Rev.**, v. 28, p. 627–632, 1995.

COUCEIRO, S. S. N. J.; COUCEIRO, S. S. E.; PINTO, V. M. A.; MACHADO, D. R.; CABRAL, C. M. Comparative evaluation of simple and sensitive assay for detection of Orthomyxo and Paramyxoviruses. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 89, p. 183-187, 1994.

CRAWFORD, P. C.; DUBOVI, E. J.; CASTLEMAN, W. L. Transmission of equine influenza virus to dog. **Science**, v. 310, p. 482-485, 2005.

DAVISON, S.; ECKROADE, R. J.; ZIEGLER, A. F. A review of the 1996-98 H7N2 nonpathogenic avian influenza outbreak in Pennsylvania. **Avian Dis.**, v. 47, p. 823-827, 2003.

DOANE, F. W.; ANDERSON, N. **Electron microscopy in diagnostic virology: a practical guide and atlas**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. 178 p.

DONIS, R. O.; BEAN, W. J.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. Distinct lineages of influenza virus H4 hemagglutinin genes in different regions of the world. **Virology**, v. 169, p. 408-417, 1989.

DOWDLE, S. G. C. Laboratory propagation of human influenza viruses, experimental host range and isolation from clinical materials. In: KILBOURNE, E. D. **The influenza viruses and influenza**. Academic Press, 1975. p. 243–268.

DOWNIE, J. C.; LAVER, W. G. Isolation of a type A influenza virus from a Australian Pelagic Bird. **Virology**, v. 51, p. 259-269, 1973.

DUCATEZ, M. F.; WEBSTER, R. G.; WEBBY, R. J. Animal influenza epidemiology. **Vaccine**, v. 4, p. 67-69, 2008.

EASTERDAY, B. C.; TUMOVÁ, B. Avian influenza. In: HOFSTAD, M. S; ALNEK, B. N.; HELMBOLDT, C. F.; REID, W. M.; YODER, V. R. H. W. (Ed.). **Diseases of poultry**, 7th ed. 1978. p. 670-700.

FATUMBI, O.; NEWMAN, J. A.; SILVANANDAN, V. Effect of temperature on stability of avian influenza virus antigens under different storage condition. **Avian Dis.**, v. 37, p. 639-646, 1993.

FERREIRA, C. S. **Circulação do vírus da Influenza A em patos domésticos da região Amazônica através da detecção de anticorpos utilizando o método de Inibição de Hemaglutinação**. 2010. 103 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

FONSECA, M. E. F.; FRIMER, N.; MENDONÇA, R. E. A.; COUCEIRO, J. N. S. S.; MACHADO, R. D. A combined staining technique developed for vírus particle observation in the electron microscope. **Rev. Bras. Biol.**, v. 44, p. 37-40, 1984.

FORMAN, A. J.; PARSONSON, I. M.; DOUGHTY, W. J. The pathogenicity of an avian influenza vírus isolated in Vitoria. **Aust. Vet. J.**, v. 63, p. 294-296, 1986.

FOUCHIER, R. A. M.; SCHNEEBERGER, P. M.; ROZENDAL, F. W.; BROEKMAN, J. M.; KEMINK, S. A.; MUNSTER, V.; KUIKEN, T.; RIMMELZWAAN, G. F.; SCHUTTEN, M.; VAN DOORNUM, G. J.; KOCH, G.; BOSMAN, A.; KOOPMANS, M.; OSTERHAUS, A. D. Avian Influenza A (H7N7) associated with human conjunctivitis and fatal case of acute respiratory distress syndrome. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 1, p. 1356-1361, 2004.

Frank, A. L.; Couch, R. B.; Griffis, C.; Baxter, B. D. Comparison of different tissue cultures for isolation and quantitation of Influenza in parainfluenza viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 10, p. 32-36, 1979.

GARCÍA, M.; SUAREZ, D. L.; CRAWFORD, J. M.; LATIMER, J. W.; SLEMONS, R. D.; SWAYNE, D. E.; PERDUE, M. L. Evolution of H5 subtype avian influenza A viruses in North America. **Virus Res.**, v. 51, n. 2, p. 115-124, 1997.

GOLONO, M. A. **Epidemiologia e caracterização molecular do vírus da Influenza Aviária em aves residentes e migratórias no Brasil**. 2009. 103 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GONZALES, S.; ORTIN, J. Characterization on influenza virus PB1 protein binding to viral RNA: two separate regions of the protein contribute to the interaction domain. **J. Virol.**, v. 73, n. 194, p. 631-637, 1999.

GORMAN, O. T.; BEAN, W. J.; KAWAOKA, Y.; DONATELLI, I.; GUOAND, Y.; WEBSTER, R. G. Evolution of Influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origins of h1n1 human and classical swine viruses. **J. Virol.**, v. 65, p. 3704-3714, 1991.

GOVOROVA, E. A.; KAVERIN, N. V.; GUBAREVA, L. V.; MEIGNEIER, B.; WEBSTERS, R. G. Replication of Influenza A viruses in a Green monkey kidney continuous cell line (Vero). **J. Infect. Dis.**, v. 172, p. 250-253, 1995.

guan, y. i.; SHORTRIDGE, K. F.; KRASS, S.; WEBSTER R. G. Molecular characterization of H9N2 influenza viruses: were they the donors of the internal genes of H5N1 viruses in Hong Kong? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 96, p. 9363-9367, 1999.

GUAN, Y.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; ZHU, H.; WANG, J.; SMITH, G. J. The emergence of pandemic influenza viruses. **Protein Cell.**, v. 1, p. 9-13, 2010.

HARDER, T. C.; VAHLENKAMP, T. W. Influenza virus infections in dogs and cats. **Vet. Immunopathol.**, v. 15, p. 54-60, 2010.

HINSHAW, V. S.; BEAN, W. J.; GERACI, J.; FIORELLI, P.; EARLY, G.; WEBSTER, R. G. Characterization of two influenza A viruses from a pilot whale. **J. Virol.**, v. 58, p. 655-656, 1986.

Hirst, G. K. Agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with Influenza Virus. **Science**, v. 94, p. 22-23, 1941.

HOFFMANN, E.; STECH, J.; LENEVA, I.; KRAUSS, S.; SCHOLTISSEK, C.; CHIN P. S.; PEIRIS, M.; SHORTRIDGE, K. F. Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China. **J. Virol.**, v. 74, p. 6309-6315, 2000.

HÖFLING, L.; CAMARGO, H. F. A. **Aves no campus, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo**. 2. ed. São Paulo: Edusp, 1993.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. A possible mechanic for selection of virulence avian Influenza A viruses in 14-days-old embryonated eggs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, p. 273-275, 1998.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. **Clinical. Microbiol. Reviews**, p.129-149, 2001.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. **J. Virol.**, v. 68, p. 3120-3128, 1994.

INPANBUTR, N.; SLEMONS, R. D. Immunocytochemical localization of type A influenza virus nucleoprotein in chicken kidney, using freeze substitution technique for tissue fixation. **Am. J. Vet. Res.**, v. 54, p. 425-428, 1993.

ITO, T.; GORMAN, O. T.; KAWAOKA, Y.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. **J. Virol.**, v. 65, p. 5491, 1991.

ITO, T.; SUZUKI, Y.; MITNAUL, L.; VINES, A.; KIDA, H.; KAWAOKA, Y. A receptor specificity viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. **Virology**, v. 227, p. 493-499, 1997.

ITO, T.; SUZUKI, Y.; TAKADA, A.; KAWAMOTO, A.; OTSUKI, K.; MASUDA, H.; YAMADA, M.; SUZUKI, T.; KIDA, H.; KAWAOKA, Y. Differences in sialic acid-galactose linkages in the chicken egg amnion and allantoic influenza human influenza virus receptor specificity and variant selection. **J. Virol.**, v. 4, p. 3357-3362, 1997.

JIN, H.; LESER, G. P.; LAMB, R. A. The influenza virus hemagglutinin cytoplasmic tail is not essential for virus assembly or infectivity. **EMBO J.**, v. 15, p. 5504-5515, 1994.

JIN, T.; CHANGHU, I. Z.; WENBAO, Q. I.; CHENGGANG, X.; LIHONG, H.; HUANAN, L.; MING, L. Genome Sequence of A Novel Reassortant H3N2 Avian Influenza Virus in Southern China. **J. Virol.**, v. 86, p. 9553–9554, 2012.

KANG, S. J.; LEE, J. M.; HAH, J. O.; SHIM Y. J.; LEE, K. S.; SHIN, H. J.; KIM, H. S.; CHOI, E. J.; JEON, S. E.; LIM, Y. T.; PARK, J. K.; PARK, E. S. Novel influenza A (H1N1) 2009 infection in the pediatric patients with hematologic and oncologic diseases in the Yeungnam region. **Korean J. Pediatr.**, v. 54, p. 117-122, 2011.

KARASIN, A. I.; BROWN, I. H.; CARMAN, S.; OLSEN, C. W. Isolation and characterization of H4N6 avian influenza viruses from pigs with pneumonia in Canada. **J. Virol.**, v. 74, p. 9322 - 9327, 2000.

KAWAMOTO, A. H. N.; CATROXO, M. H.; MANCINI, D. A. P. Identificação direta do vírus da Influenza A de amostras coletada de aves. **Mem. Inst. Butantan**, São Paulo, v. 65, 2008. 1 CD-ROM. (Reunião Científica Anual do Instituto Butanta, 10, 2008, São Paulo).

KAWAMOTO, A. H. N.; MANCINI, D. A. P.; PEREIRA, L. E.; CIANCIARULLO, A. M.; CRUZ, A. S.; DIAS, A.L. F.; MENDONÇA, R. M. Z.; PINTO, J. R.; DURIGON, E. L. Investigation of Influenza in Migrating Birds, the Primordial Reservoir and Transmitters of Influenza In Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 88-93, 2005.

KAWAMOTO, A. H. N.; MANCINI, D. A. P.; MENDONÇA, R. M. Z.; DIAS, L. F.; PINTO, J. R.; MUNHOZ, P. B. S.; DURIGON, E. L. Characterization of Avian Influenza A Virus by Duplex RT - PCR assay and Influenza A/B Rapid and Chromatograph Test. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 13, 2002, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia, 2002. p. 134. FLU-15. (Virus Rev. Res.: J. Bras. Society for Virology).

KAWAMOTO, A. H. N.; MANCINI, D. A. P.; PEREIRA, L. E.; THOMAZELLI, L. M; ARAUJO, J; RODRIGUES, J. N. M; DURIGON, E. L. Sequencing analyses of influenza A samples isolated from wild, migrating and residents birds in São Paulo State, Brazil. In: ENCONTRO NACIONAL DE VIROLOGIA, 15., 2004, Águas de São Pedro. **Resumos...** Águas de São Pedro, 2004. p. 130. (Virus Rev. Res.: J. Bras. Society for Virology).

KAWAOKA, Y.; YAMNIKOVA, S.; CHAMBERS, T. M.; LVOV, D. K.; WEBSTER, R. G. Molecular characterization of a new hemagglutinin, subtype H14, of influenza A virus. **Virology**, v. 179, p. 759-767, 1990.

KHANNA, M.; KUMAR, P.; CHOUDHARY, K.; KUMAR, B.; VIJAYAN, V. K. Emerging influenza virus: A global threat. **J. Biosci.**, v. 33, p. 475-482, 2008.

KIDA, H.; ITO, T.; YASUDA, J.; SHIMIZU, Y.; ITAKURA, C.; SHORTRIDGE, K. F.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 2183-2188, 1994.

KILBOURNE, E. D. Influenza pandemics: can we predict the unpredictable? **Viral Immunol.**, v. 17, p. 350-357, 2004.

KISO, M.; ISHIDA, H.; KAWAOKA, Y. Sialic acid species as a determinant of the host range of influenza A viruses. **J. Virol.**, v. 74, p. 11825-11831, 2000.

KLENK, H. D.; ROTT, R.; ORLICH, M.; BLODORN, J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. **Virology**, v. 68, p. 426-439, 1975.

KLINGEBORN, B.; ENGLUND, L.; ROTT, R.; JUNTI, N.; ROCKBORN, G. An avian influenza A virus killing a mammalian species-mink. **Brief Report Arch. Virol.**, v. 86, p. 347-351, 1985.

KOOPMANS, M.; WILBRINK, B.; CONYN, M.; NATROP, G.; VAN DER NAT, H.; VENNEMA, H.; MEIJER, A.; VAN STEENBERGEN, J.; FOUCHIER, R.; OSTERHAUS, A. D.; BOSMAN, A. Transmission of H7N7 avian influenza A virus to human beings during a large outbreak in commercial poultry farms in the Netherlands. **Lancet**, v. 363, p. 587-93, 2004.

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

KRUG, R. M.; MORGAN, M. A.; SHATKIN, A. J. Influenza viral mRNA contains internal N6-methyladenosine and 5'-terminal 7-methylguanosine in cap structures. **J. Virol.**, v. 20, p. 45-53, 1976.

KUNDIN, W. D. Hong Kong influenza A virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. **Nature**, v. 228, p. 857, 1970.

KURTZ, J.; MANVELL, R. J.; BANKS, J. Avian influenza virus isolated from a woman with conjunctivitis. **Lancet**, v. 348, p. 901-902, 1996.

LAI, A.C.; MC PHILLIPS, A.M. Isolation of avian influenza viruses in central Oklahoma. **State Med. Assoc.**, v. 92, p.565-567, 1999.

LAMB, R. A.; KRUG, R. M. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.) **Fields Virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 2007. p. 1353-1395.

LAUDERT, E.; SIVANANDAN, V.; HALVORSON, D.; SHAW, D.; WEBSTER, R. G. Biological and molecular characterization of H13N2 influenza type A viruses isolated from turkeys and surface water. **Avian Dis.**, v. 37, p. 793-799, 1993.

LAVIER, G.; GARMAN, E. Pandemic influenza: its origin and control. **Microbes Infect.**, v. 4, p. 1309-1316, 2002.

LEE, H. J.; KWON, J. S.; LEE, D. H.; LEE, Y. N.; YOUN, H. N.; LEE, Y. J.; KIM, M. C.; JEONG, O. M.; KANG, H. M.; KWON, J. H.; LEE, J. B.; PARK, S. Y.; CHOI, I. S.; SONG, C. S. Continuing evolution and interspecies transmission of influenza viruses in live bird markets in Korea. **Avian Dis.**, v. 54, p. 738-748, 2010.

LIN, Y. P.; SHAW, M.; GREGORY, V.; CAMERON, K.; LIM, W.; KLIMOV, A.; SUBBARAO, K.; GUAN, Y.; KRAUSS, S.; SHORTRIDGE, K.; WEBSTER, R. G.; COX, N.; HAY, A. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 97, p. 9654-9658, 2000.

LU, C. Y.; LU, J. H.; CHEN, W. Q.; JIANG, L. F.; TAN, B. Y.; LING, W. H.; ZHENG, B. J.; SUI, H. Y. Potential infections of H5N1 and H9N2 avian influenza do exist in Guangdong populations of China. **Chin. Med. J.**, v. 20, p. 2050-2053, 2008.

LUO, G.; COLONNO, R.; KRYSTAL, M. Molecular mechanisms underlying the action of a novel fusion inhibitor of influenza A. **J. Virol.**, v. 71, p. 4062-4070, 1997.

MAKAROVA, N.; KAVERIN, N.; KRAUSS, S.; SENNE, D.; WEBSTER, R. G. Transmission of Eurasian avian H2 influenza virus to shorebirds in North America. **J. Gen. Virol.**, v. 80, p. 3167-3171, 1999.

MANCINI, D. A. P.; MENDONÇA, R. M. Z.; DIAS, A. L. F.; KAWAMOTO, A. H. N.; PINTO, J. R.; MENDONÇA, R. Z. Receptor specificity of erythrocytes from different species related to swine, equine, avian and human influenza viruses. **Virus Rev. Res.: J. Bras. Society for Virology**, v. 8, n.1, p. 7-15, 2003.

MANCINI, D. A. P.; MENDONÇA, Z. M. R.; PINTO, R. J.; TEIXEIRA, S. A. Influenza eqüina: avaliação da resposta imunohumoral, através das reações de inibição de Hemaglutinação e de Hemólise Radial Simples, em soro de animais vacinados com vacina comercial e experimental. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 1, p. 3-5, 1996.

MANCINI, D. A. P.; VILELA, A. C.; MOREIRA, M. M. Avaliação "in vivo" da vacina bivalente contra a gripe, produzida no Instituto Butantan. **Mem. Inst. Butantan**, v. 49, p. 21-24, 1987.

MARTINS, N. R. S. Uma revisão dos últimos dez anos de influenza aviária. Avian influenza. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v. 3, n. 2, 2001.

MATROSOVICH, M.; ZHOU, N.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. **J. Virol.**, v. 73, p. 1146-1155, 1999.

MINNICH, L. L.; RAY, C. G. Early testing of cell cultures for detection of hemadsorbing viruses. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 421-422, 1987.

MITCHELL, C. A.; GUERIN, L. F.; ROBILLARD, J. Mixovirus Influenza A isolated from ducks. **Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.**, v. 31, p. 103-105, 1964.

MONTO, A. S.; MASSAB, H. F.; BRYAN, E. R. Relative efficacy of embryonated eggs in cell culture for isolation of contemporary Influenza. **J. Clin. Microbiol.**, v. 13, p. 233-235, 1981.

MUKAIGAWA, J.; NAYAK, D. P. Two signal mediated nuclear localization of influenza virus (A/WSN/33) Polymerase Basic Protein 2. **J. Virol.**, v. 65, p. 245-253, 1991.

MUNCH, M.; NIELSEN, L. P.; ANDBERG, J. K.; JORGENSE, N. H. P. Detection a subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription – PCR and ELISA. **Arch. Virol.**, v. 146, p. 87–97, 2001.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 1397-1445.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomixoviruses. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1397–1445.

NAIM, H. Y.; ROTH, M. G. Basis for selective incorporation of glycoproteins into the influenza virus envelope. **J. Virol.**, v. 67, p. 4831-4841, 1993.

NATH, S. T.; NAYAK, D. P. Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1). **Mol. Cell. Biol.**, v. 10, p. 4139-4145, 1990.

NEROME, K.; NAKAYAMA, M.; ISHIDA, M.; FUKUMI, H.; BUTTERFIELD, W. K.; WEBSTER, R. G.; CAMPBELL, C. H. Isolation and serological characterization of Influenza A viruses from birds that were dead on arrival at Tokyo Airport. **Arch. Virol.**, v. 57, p. 261-270, 1978.

NEUMANN, G.; CASTRUCCI, M. R.; KAWAOKA, Y. Nuclear Import and export of influenza virus nucleoprotein. **J. Virol.**, v. 71, p. 9690-9700, 1997.

NEUMANN, G.; HUGHES, M. T.; KAWAOKA, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. **EMBO J.**, v. 19, p. 6751–6758, 2000.

NFON, C.; BERHANE, Y.; ZHANG, S.; HANDEL, K.; LABRECQUE, O.; PASICK, J. Molecular and antigenic characterization of triple-reassortant h3n2 swine influenza viruses isolated from pigs, turkey and quail in Canada. **Transbound Emerg. Dis.**, v. 58, p. 394-401, 2011.

NFON, C.; BERHANE, Y.; ZHANG, S.; HANDEL, K.; LABRECQUE, O.; PASICK, J. Molecular and antigenic characterization of triple-reassortant H3N2 swine influenza viruses isolated from pigs, turkey and quail in Canada. **Transbound Emerg. Dis.**, v. 58, p. 394-401. 2011.

OTSUKI, K.; YAMAZAKI, K.; KAWAOKA, Y.; TSUBOKURA, M. infectivity for mice of avian influenza A viruses of H7N7, H5N3 and H2N2 subtypes isolated from migratory

waterfowls in San in District, Western Japan. **Nippon Juigaku Zasshi**, v. 49, p. 199-201, 1987.

OZAKI, K.; YANAGAWA, R.; KIDA, H.; NODA, H. Human influenza virus infection in mink: serological evidence of infection in Summer and autumn. **Vet. Microb.**, v. 8, p. 251-257, 1983.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1647-1689.

PANIGRAHY, B.; SENNE, D. A.; PEDERSEN, J. C.; SHAFER, A. L.; PEARSON, J. E. Susceptibility of pigeons to avian influenza. **Avian Dis.**, v. 40, p. 600-6004, 1996.
 PARKC, H.; ISHINAKA, M.; TAKADA, A.; KIDA, H.; KIMURA, T.; OCHIAI, K.; UMEMURA, T. The invasion routes of neurovirulent A/Hong/Kong/483/97(H5N1) influenza virus into central nervous system after respiratory infection in mice. **Arch. Virol.**, v. 147, p. 1425-1436, 2002.

PEIRIS, J. Avian influenza in North and South America, 2002-2005. **Avian Disease**, v. 51, p. 167-73, 2007.

PEIRIS, J. S.; YU, W. C.; LEUNG, C. W.; CHEUNG, C. Y.; NG, W. F.; NICHOLLS, J. M.; NG, T. K.; CHANG, K. H.; LAI, S. T.; LIM, W. L.; YUEN, K. Y.; GUAN, Y. Re-emergence of Fatal Human Subtype H5N1 Disease. **Lancet**, v. 21, p. 582-583, 2004.

PEREIRA, H. G.; TUMOVÁ, B.; LAW, G. Avian Influenza A viruses. **Bull. WHO**, v. 32, p. 855-860, 1965.

PEREIRA, L. E.; SUZUKI, A.; SOUZA, R. P.; SOUZA, M. F. C.; FLAUTO, G. Sazonalidade das populações de *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766) aves, Vireonidade) em regiões da Mata Atlântica do Estado de São Paulo. **Ararajuba**, v. 6, p. 117-122, 1998.

PIELAK, R. M.; CHOUA, J. J. Kinetic analysis of the M2 proton conduction of the influenza virus. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 132, p. 17695-17697, 2010.

PORTELA, A.; EDIGARD, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **J. Gen. Virol.**, v. 83, p. 723-734, 2002.

QIU, B.; LIU, W.; PENG, D.; HU, S.; LIU X. Distribution of avian influenza virus subtypes among domestic ducks in eastern China. **Wei Sheng Wu Xue Bao**, v. 48, p. 1290-1294, 2008.

READING, P. C.; MILLER, J. L.; ANDERS, M. Involvement of the mannose receptor in infection of macrophages by influenza virus. **J. Virol.**, v. 74, p. 5190-5197, 2000.

REINA, J.; FERNANDES, V.; BLANCO, I.; MUNAR, M. Comparison of madin darby canine kidney cells (mdk) with green monkey continuous cell line (vero) and human lung embryonated cells (mrc-5) in the isolation of influenza A virus from

nasopharyngeal aspirates by shell viral culture. **J. Clinic. Microbiol.**, v. 35, p. 1900-1901, 1997.

RESENDE, J. S.; OLIVEIRA, R. L.; JORGE, M. A.; RESENDE, M. Influenza A antibodies in Broilers in Brasil after American Outbreaks of 1983-1984. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, p. 453-454, 1990.

RICHARDSOM, J. C.; AKKINA, R. K. NS2 Protein of influenza vírus is found in purified vírus and phosphorylated. **Infect Cell. Arc. Virol.**, v. 116, p. 69-80, 1991.

ROBERTS, D. H. Isolation of Influenza A virus and a mycoplasma associated with duck sinusitis. **Vet. Rec.**, v. 76, p. 470-473, 1964.

ROTT, R.; SCHAFER, W. Physicochemical and biological characters of virus N and its relation to the influenza subgroup A of myxoviruses. **Zentralblatt fuer Veterinaermedizin**, v. 7, p. 237-248, 1960.

ROWAN, M. K. A mortality among European common terns in South Africa in Abril, May 1961. **Br. Birds**, v. 55, p. 103-114, 1962.

SAITO, T.; HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y.; SENNE, D. A.; WEBSTER, R. G. Emergence of potential pathogenic H5N2 influenza virus in chickens. **Virology**, v. 201, p. 277-284, 1994.

SALCEDO CHAVES, J. R. **Ocorrência de influenza em aves selvagens e pássaros ornamentais no Rio de Janeiro**. 1980. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1980.

SCHROEDER, C.; FORD, C. F.; WHARTON, S. A.; HAY, A. J. Functional reconstitution in lipid vesicles of influenza virus M2 protein expressed by baculovirus: evidence for proton transfer activity. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 3477-3484, 1994.

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

SHÄFER, R. J.; KAWAOKA, Y.; BEAN, J. W.; SÜSS, J.; SENNE, D. A.; WEBSTER, R. G. Origin of the pandemic 1957 H2 Influenza A Vírus and the persistence of its possible progenitors in avian reservoir. **Virology**, v. 194, p. 781-788, 1993.

SHARP, G. B.; KAWAOKA, Y.; JONES, D. J.; BEAN, W. J.; PRYOR, P. S.; HINSHAW, V.; WEBSTER, R. G. Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. **J. Virol.**, v. 6, p. 128-135, 1997.

SHARP, G. B.; KAWAOKA, Y.; WRIGHT, S. M.; TURNER, B.; HINSHAW, V.; WEBSTER, R. G. Wild ducks are the reservoir for only a limited number of influenza A subtypes. **Epidemiology and Infection**, v. 110, p. 161-176, 1993.

SHOLTISSEK, C. Source for influenza pandemics. **Eur. J. Epidemiol.**, v. 10, p. 455-458, 1994.

SHORTRIDGE, K. F. Characterization of H5N1 influenza virus that continue to circulated in geese in southerastern China. **J. Virol.**, v. 76, p. 118-126, 2002.

SHORTRIDGE, K. F. H2N2 Influenza viruses in domestic ducks. **Lancet**, v. 1, p. 24, 1979.

SHU, L. L.; ZHOU, N. N.; SHARP, B. G. B; HE, Q. S.; ZHANG, J. T.; WEBSTER, G. R. An epidemiological study of influenza viruses among chinese farm families with household ducks and pigs. **Epidemiol. Infect.**, v. 117, p. 179-188, 1996.

SILVANANDAN, V.; HALVORSON, D. A.; LAUDERT, E.; SENNE, D. A.; KUMAR, M. C. Isolation of H13N2 Influenza A virus from turkey and surface water. **Avian Dis.**, v. 35, p. 974-977, 1991.

SINNECKER, R.; SINNECKER, H.; ZILSKE, E.; KÖHLER, D. Surveillance of pelagic birds for Influenza A Viruses. **Acta. Virol.**, v. 27, p. 75-79, 1983.

SMITH, G. J.; BAHL, J.; VIJAYKRISHNA, D.; ZHANG, J.; POON, L. L.; CHEN, H.; WEBSTER, R. G.; PEIRIS, J. S.; GUAN, Y. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 14, p. 11709 -11712, 2009.

SMITH, G.; VIJAYKRISHNA, D.; BAHL, J.; LYCETT, S.; WOROBEY, M.; PYBUS, O.; MA, S.; CHEUNG, C.; RAGHWANI, J.; BHATT, S.; PEIRIS, J.; GUAN, Y.; RAMBAUT, A. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. **Nature**, 2009. doi:10.1038/nature08182.

SOARES, P .B. M.; DEMETRIO, C.; SANFILIPO, L.; KAWAMOTO, A. H. N.; DURIGON, E. L. Standardization of duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. **J. Virol. Methods.**, v. 123, p. 125-130, 2005.

SPACKMAN, E.; SENNE, D. A.; DAVISON, S.; SUAREZ, D. L. Sequence analysis of recent H7 avian influenza viruses associated with three different outbreaks in commercial poultry in the United States. **J. Virol.**, v. 77, p. 13399-13402, 2003.

SPRENGER, M. J.; MULDER, P. G.; BEYER, W. E.; VAN, S. R.; MASUREL, N. Impact of influenza on mortality in relation to age and underlying disease. **Int. J. Epidemiol.**, v. 22, p. 334-340, 1993.

STECH, J.; XIONG, X.; SCHOLTISSEK, C.; WEBSTER, R. G. Independence of evolutionary and mutational rates after transmission of avian influenza viruses to swine. **J. Virol.**, v. 73, p. 1878-1884, 1999.

STOUFFER, D.; MAC CRISTIAN, L.; OHIGASHI, Y.; LAMB, R. A.; LEAR J. D.; PINTO, L. H, DEGRADO, W. F. The interplay of functional tuning, drug resistance, and thermodynamic stability in the evolution of the M2 proton channel from the influenza A virus. **Structure**, v. 16, p. 1067-1076, 2008.

STUBBS, E. L. Fowl plaque. In: BIESTER, H. E.; SCHUARTE, L. H. (Ed.). **Disease of Poultry**. 4th ed. Iowa: State University Press, 1965.

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

SUAREZ, D. L.; WOOLCOCK, P. R.; BERMUDEZ, A. J.; SENNE, D. A. Isolation from turkey breeder hens of a reassortant H1N2 influenza virus with swine, human, and avian lineage genes. **Avian Dis.**, v. 46, p. 111-121, 2002.

SUAREZ, D. L.; SENNE, D. A. Sequence analysis of related low-pathogenic and highly pathogenic H5N2 avian influenza isolates from United States live bird markets and poultry farms from 1983 to 1989. **Avian Dis.**, v. 44, p. 356-364, 2000.

SUBBARAO, K.; KLIMOV, A.; KATZ, J.; REGNER, H.; LIM, W.; HALL, H.; PERDUE, M.; SWAYNE, D.; BENDER, C.; HUANG, J.; HEMPHILL, M.; ROWE T.; SHAW, M.; XU, X.; FUKUDA, K.; COX, N. Characterization of an avian influenza A(H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. **Science**, v. 279, p. 393-396, 1998.

SUBBARAO, K.; KATZ, J. Avian Influenza Viruses Infecting Humans. **Cell. Mol. Life sci.**, v. 57, p. 1770-1784, 2000.

SUBBARAO, K.; WEBSTER, R. G.; KAWAOKA, Y.; MURPHY, B. R. Are there alternative avian influenza viruses for generation of stable attenuated avian-human influenza A reassortant viruses? **Virus Res.**, v. 39, p. 105-118, 1995.

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

SUSS, J.; SHAFER, J.; SINNECKER, H.; WEBSTER, R. G. Influenza virus subtypes in aquatic birds of eastern Germany. **Arch. Virol.**, v. 135, p. 101-114, 1994.

SUZUKI, Y.; ITO, T.; SUZUKI, T.; HOLLAND, R. E. JR.; CHAMBERS, T. M.; TENG, Q.; HU, T.; LI, X.; LI, G.; LI, Z. Complete genome sequence of an H3N2 avian influenza virus isolated from a live poultry market in eastern China. **J. Virol.**, v. 86, n. 21, p. 11944, 2012.

THOMAZELLI, L. M.; VIEIRA, S.; LEAL, A.; SOUSA, T. S. V.; OLIVEIRA, D. B. L.; GOLONO, M. A.; GILLIOV, A. E.; STWIENVI KLAUS, E.; DEAN, D. Vigilância de oito vírus respiratórios em amostras clínicas de pacientes pediátricos no sudeste do Brasil. **J. Pediatr.**, v. 83, n. 5, p. 422-428, 2007.

TRAMPUZ, A.; PRABHU, R. M.; SMITH, T. F.; BADDOUR, L. M. Avian influenza: a new pandemic threat? **Mayo Clin. Proc.**, v. 79, p. 523-530, 2004.

UYEKI, T. M.; CHONG, Y. H.; KATZ, J. M.; LIM, W.; HO, Y. Y.; WANG, S. S.; TSANG T. H.; AU, W. W.; CHAN, S.C.; ROWE, T.; HU-PRIMMER, J.; BELL, J. C.; THOMPSON, W. W.; BRIDGES, C. B.; COX, N. J.; MAK, K. H.; FUKUDA, K. Lack of

evidence for human-to-human transmission of avian influenza A (H9N2) viruses in Hong Kong, China 1999. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 2, p. 154-159, 2002.

WALKER, J. A.; KAWAOKA, Y. Importance of conserved amino acids at the cleavage site of the haemagglutinin of a virulent avian influenza A virus. **J. Gen. Virol.**, v. 74, p. 311-314, 1993.

WANG, P.; PALESE P.; O'NEILL, R. E .The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. **J. Virol.**, v. 71, p. 1850-1856, 1997.

WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Are we ready for pandemic influenza? **Science**, v. 302, p. 1519–1522, 2003.

WEBSTER, R. G. Are equine influenza viruses still present in horses? **Equine Vet. J.**, v. 56, p. 537-538, 1993.

WEBSTER, R. G. Coinfection of wild ducks by Influenza A Viruses: Distribution patterns and biological significance. **J. Virol.**, v. 71, p. 6128-6135, 1997.

WEBSTER, R. G. Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic. **Arch. Virol. Suppl.**, v. 13, p. 105-113, 1997.

WEBSTER, R. G. Influenza: Interspecies transmission and emergence of new pandemics. **F. E. M. S. Immunol. Med. Microbiol.**, v. 18, p. 275-279, 1997.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBERS, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol. Rev.**, v. 176, p. 152-179, 1992.

WEBSTER, R. G.; GUO, Y. J. New influenza virus in horses. **Nature**, v. 51, p. 527-530, 1991.

Webster, R. G.; Morita, M.; Pridge, S.; TUMOVA, B. Ortho-and Paramyxoviruses from migrating feral ducks: characterization of a new group of Influenza A Viruses. **J. Gen. Virol.**, v. 32, p. 217-225, 1976.

WEBSTER, R. G.; ROTT, R. Influenza virus A pathogenicity. The pivotal role of haemagglutinin. **Cell**, v. 50, p. 665-666, 1987.

WEBSTER, R. G.; TAYLOR, J.; PERSON, J.; RIVIERA, E.; PAOLETTI, E. Immunity to Mexican H5N2 avian Influenza viruses induced by a fowl pox-H5 recombinant. **Avian Dis.**, v. 40, p. 461-465, 1996.

WEBSTER, R. G.; YAKHNO, M.; HINSHAW, V. S.; BEAN, W. J.; MURTI, K. G. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. **Virology**, v. 84, p. 268-278, 1978.

WEBSTER, R. G.; LAVER, W. G. Determination of the number of nonoverlapping antigenic areas on Hong Kong (H3N2) influenza virus hemagglutinin with monoclonal

antibodies and the selection of variants with potential epidemiological significance. **Virology**, v. 104, p. 139-148, 1980.

WOOD, G. W.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; STRONG, I.; ALEXANDER, D. J. The nucleotide sequence of the HA1 of the haemagglutinin of an HI avian influenza virus isolate from turkeys in Germany provides additional evidence suggesting recent. **Avian Pathol.**, v. 26, n. 2, p. 347-355, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Seasonal influenza flu.avian influenza A (H7N9) virus**. Disponível em: Acesso em: 17 abr. 2013

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Transmission of influenza viruses from animals to people**.. Disponível em: <http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm/weekly/index.htm?s> Acesso em: 10 abr. 2013.

WRIGHT, P. F.; NEUMANN, G ; KAWAOKA, R. G. Orthomixoviruses. In: FIELDS, N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields virology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007. p. 1691-1724.

XU, X.; COX, N. J.; BENDER, C. A.; REGNER, H. L.; SHAW, M. W. Genetic variation in neuraminidase genes of influenza A (H3N2) viruses. **Virology**, v. 224, p. 175–183, 1996.

YAMANE, N.; ODAGIRI, T.; ARIKAWA, J.; ISHIDA, N. Isolation and characterization of Influenza A Viruses from wild ducks in northern Japan: appearance of HSW1 antigens in the Japanese duck population. **Acta Virol.**, v. 23, p. 375-384, 1979.

YASSINE, H. M.; LEE, C. W.; SAIF, Y. M. Interspecies transmission of influenza A viruses between swine and poultry. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 40, p. 370-227, 2013.

YASSUDA, J.; NAKADA, S.; KATO, A.; TOYOTA, T.; ISHIHARA, A. Molecular assembly of influenza virus, association of NS2 protein with virion matrix. **Virology**, v. 196, p. 246-255, 1993.

YASSUDA, J.; SHORTRIDGE, K. F.; SHIMIZU Y.; KIDA H. Molecular evidence for a role of domestic ducks in the introduction of avian H3 influenza viruses to pigs in southern China, where the A/Hong Kong/68 (H3N2) strain emerged. **J. Gen. Virol.**, v. 72, p. 2007-2010, 1991.

YUEN, K. J.; CHAN, P. K.; PEIRIS, M. T.; SONG, D. N.; QUE, T. L.; SHORTRIDGE, K. F.; NG, P. T.; TO, W. K.; HO, E. T.; SUNG, R.; CHENG, A. F. Clinical features and rapid viral diagnosis of human disease associated with avian Influenza A H5N1 virus. **Lancet**, v. 14, p. 467-471, 1998.

ZELL, R.; SCHOLTISSEK, C.; LUDWIG, S. Genetics, evolution, and the zoonotic capacity of European Swine influenza viruses. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 370, p. 29-55, 2013.

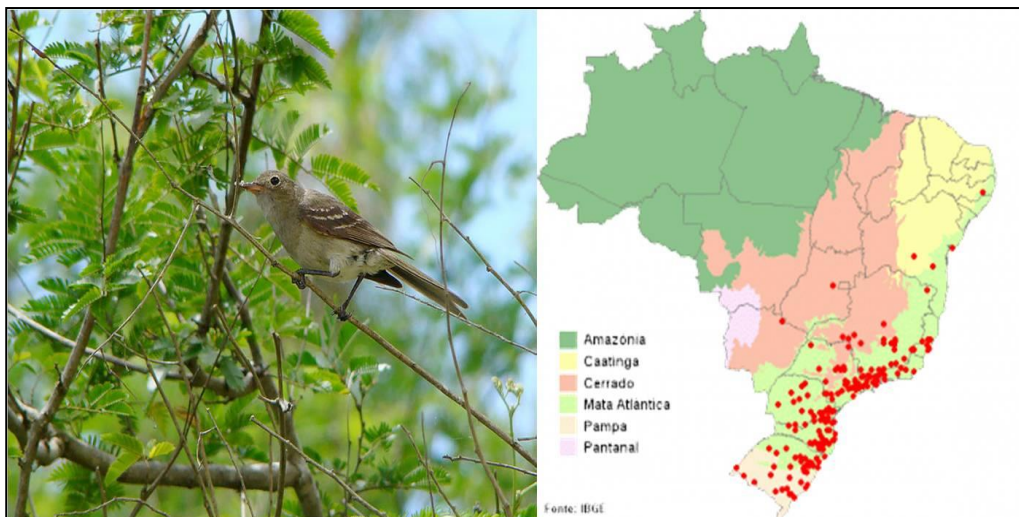
ZHOU, J. J.; TIAN, J.; FANG, D. Y.; LIANG, Y.; YAN, H. J.; ZHOU, J. M.; GAO, H. L.; FU, C, Y.; LIU, Y.; NI, H. Z.; KE, C. W.; JIANG, L. F. Analysis of antigen epitopes and molecular pathogenic characteristics of the 2009 H1N1 pandemic influenza A virus in China. **Acta Virol.**, v. 55, p. 195-202, 2011b.

ZHOU, H.; ZHANG, A.; CHEN H.; JIN, M. Emergence of novel reassortant H3N2 influenza viruses among ducks in China. **Arch. Virol.**, v. 156, p. 1045-1048, 2011a.

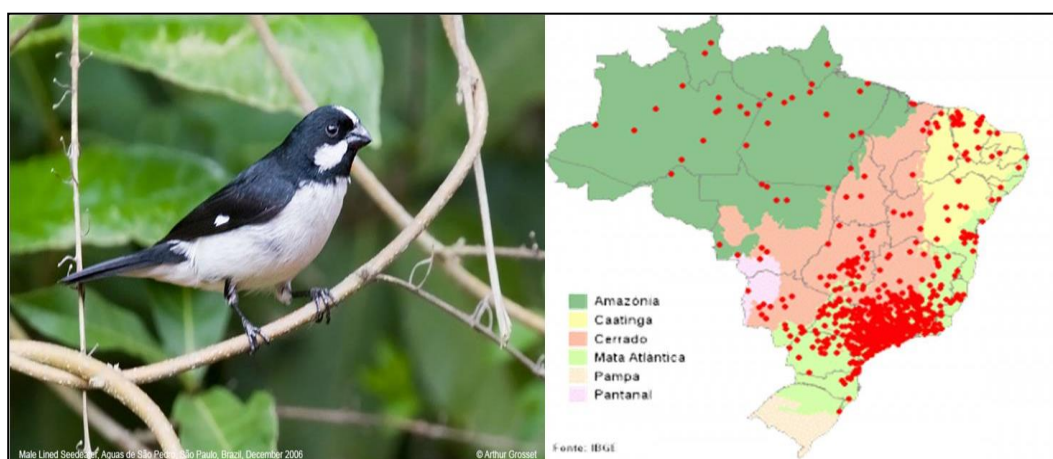
ZHOU, N. N.; SENNE, D. A.; LANDGRAF, J. S.; SWENSON, S. L.; ERICKSON, G.; ROSSOW K, LIU L, YOON Kj, KRAUSS S, WEBSTER RG. Genetic reassortment of avian, swine, and human influenza A viruses in American pigs. **J. Virol.**, v. 73, p. 8851-8856, 1999.

ANEXO - As espécies de aves que apresentaram resultado positivo para influenza a, habitat e distribuições geográficas

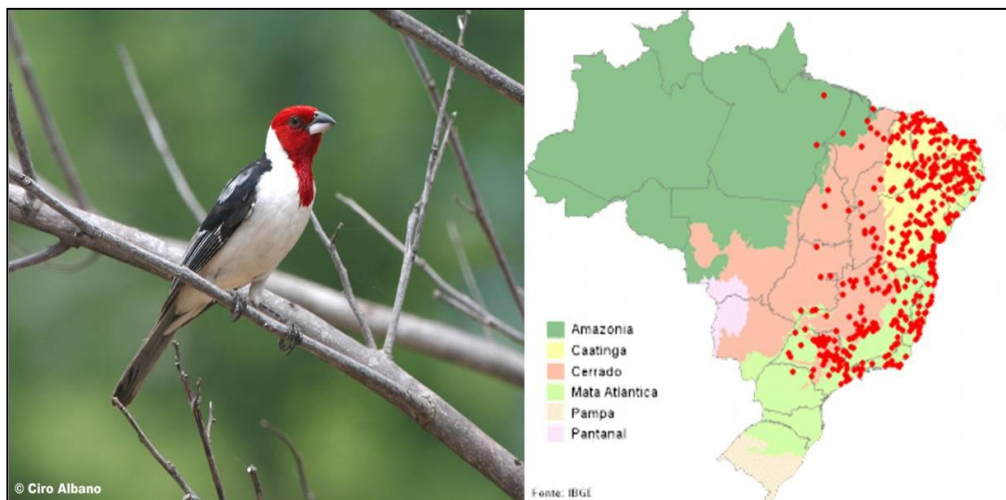
- Imagens extraídas do site: Ambiente Brasil:
<http://www.marthargel.com.br/ornitologia/aves urbanas/viol.htm>



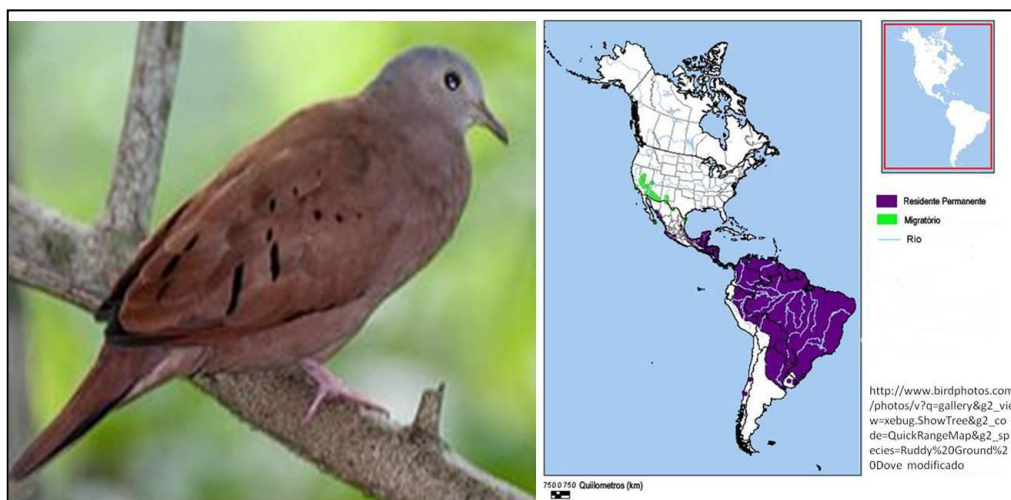
Família Tyrannidae, espécie *Elaenia mesoleuca* (Vigors, 1825), é uma ave passeriforme nome popular conhecido como tuque é muito parecido com a Guaracava-de-barriga-amarela (*Elaenia flavogaster*), porém sem topete. Habitat essas espécies de aves preferem ambientes florestados temperadas e subtropicais ou tropicais úmidas. (DEVELEY, 2004). Distribuição geográfica. encontrada nos seguintes países: Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai. Segundo Ho



Família *Emberizidae* espécie *Sporophila lineola* (Linnaeus, 1758). Também conhecido como bigode, papa-capim (Minas Gerais), gola-careta ou caretinha (Ceará), são encontradas em todo o Brasil. Seu habitat natural é em campos abertos, campos cultivados e capoeiras. Distribuição Geográfica. No Brasil são encontradas, nos estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Espírito Santo e Bahia. Durante o inverno migram para a Amazônia e para os estados do Nordeste, para os estados do Rio Grande do Norte e Ceará. No Espírito Santo e Paraná aparece em dezembro Maranhão e Piauí. São encontradas também na Argentina, Paraguai, Bolívia, Guianas, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia como migrante durante o inverno.

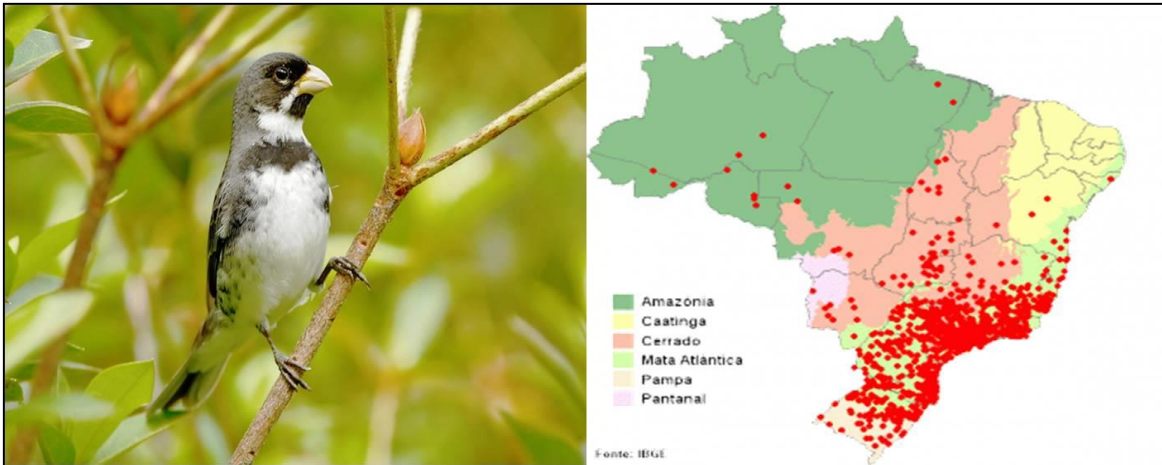


Família Thraupidae espécie *Paroaria dominicana* (Linnaeus, 1758). É uma ave passeriforme é conhecido também como galo-da-campina, cabeça-de-fita e cabeça-vermelha. Distribuição Geográfica. Estão presente no Brasil como residente; nos Estados do Paraná, São Paulo, Mato Grosso, Goiás, Espírito Santo e Bahia. Durante o inverno migra para Amazônia e para os Estados do Rio Grande do norte e Ceará. Encontrado na Argentina, Paraguai e Bolívia, Guianas, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia.

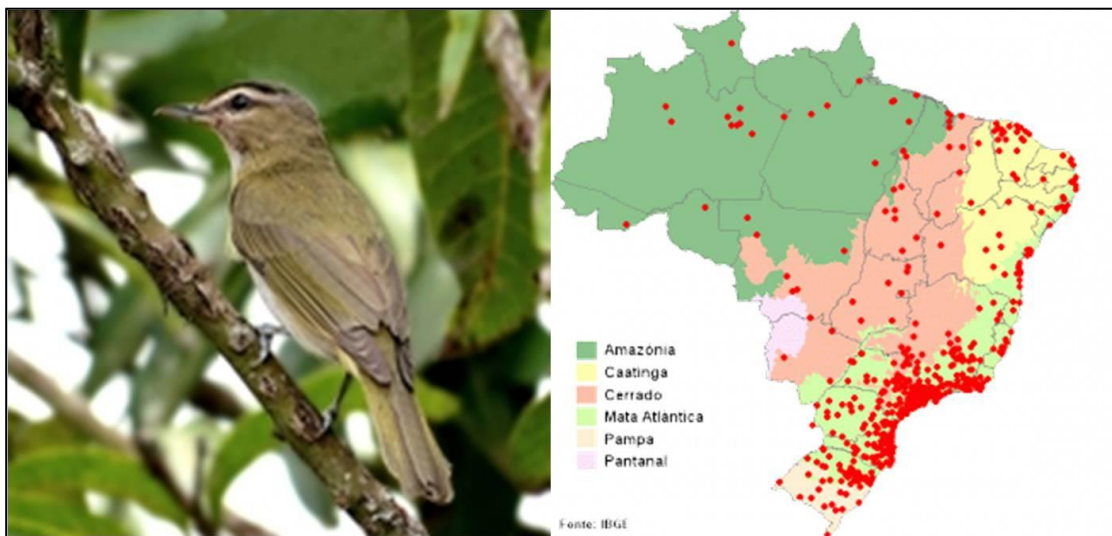


Família: Columbidae (Pigeons, Doves). Espécie: *Columbina talcopati* (Temminck, 1810)

Uma das primeiras espécies brasileiras a se adaptar ao meio urbano. Seu habitat de origem são as áreas de cerrados e campos. Conhecida também como rolinha-caldo-de-feijão (PB), picuí-peão, rola, pomba-rola, rola-cabocla (CE), rola-grande, rola-sangue-de-boi (PE e BA), rolinha, rolinha-comum, rolinha-vermelha, rolinha-juruti e pomba-café. Distribuição Geográfica Encontrada em todo o Brasil, porém raramente vista em áreas densamente florestada da Amazônia. Nos outros países são encontrada no Paraguai, Norte da Argentina, Sul de Texas e Sul de Califórnia durante o inverno.



Família Emberizidae espécie *Sporophila caerulescens* (Vieillot, 1823). É uma ave passeriforme, também conhecido como coleiro, coleirinha, papa-capim, papa-arroz ou tui tui. É a espécie mais popular do grupo dos papa-capins. Seu habitat são campos abertos e capinzais e áreas urbanas. Distribuição Geográfica - Encontrada praticamente em todo Brasil, com exceção da Região Amazônica e Nordeste.



Família Vireonidae espécie *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766). Popularmente denominada de juruvira. Distribuição Geográfica É uma espécie migratória que habita as regiões neártica e neotropical. Durante a época de reprodução migra para América do Sul e encontra-se ao leste dos Andes e Uruguai. No início da Primavera, *Vireo olivaceus* viaja para o norte através da América Central, ao longo da Costa do Golfo e em Cuba, Haiti, República Dominicana, Estados Unidos até o Canadá. Algumas populações de *Vireo olivaceus* permanecem na América do Sul (DUNFORD et al., 2002.; SIBLEY, 2000).