Miguel Augusto Golono

Epidemiologia e caracterização molecular de
vírus da Influenza em aves residentes e
migratórias no Brasil

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de
Doutor em Biotecnologia.**

**São Paulo
2009**

Miguel Augusto Golono

Epidemiologia e caracterização molecular de
vírus da Influenza em aves residentes e
migratórias no Brasil

**Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação Interunidades em
Biotecnologia USP/Instituto Butantan/
IPT, para obtenção do Título de
Doutor em Biotecnologia.**

Área de concentração: Microbiologia

**Orientador: Prof. Dr. Edison Luiz
Durigon**

São Paulo
2009

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

© reprodução total

Golono, Miguel Augusto.

Epidemiologia e caracterização molecular de vírus da influenza em aves residentes e migratórias / Miguel Augusto Golono. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Edison Luiz Durigon.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Virologia clínica e molecular.

Versão do título para o inglês: Epidemiology and molecular characterization of influenza virus in migratory and resident birds in Brazil.

Descritores: 1. Influenza 2. Vigilância epidemiológica 3. Biologia molecular I. Durigon, Edison Luiz II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia III. Título.

ICB/SBIB0222/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Miguel Augusto Golono.

Título da Tese: Epidemiologia e caracterização molecular de vírus da influenza em aves residentes e migratórias.

Orientador(a): 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:

Dedico esta tese aos meus pais:

Edson Domingos Golono e Vera L. S. Golono

A meu irmão:

Edson Domingos Golono Júnior

A minha esposa:

Ana Paula Moreira

E as minhas filhas:

Amarillyz e Izabella Politi Golono

Agradecimentos

Agradeço a meu orientador prof. Dr. Edison Luiz Durigon, pela confiança em mim depositada, pela amizade e por ser exemplo profissional e pessoal a ser seguido.

Sou grato por todos os amigos que participaram da equipe de campo e que muito ajudaram no desenvolvimento deste trabalho: Luiz Sanfilippo, Carolina Ferreira, Renata Hurtado, Tatiana Ometto, José Maria Lopes, Luciano M. Thomazelli, Cristiane Demetrio, Mário Figueiredo, Ricardo Lieutaud, Dra Danielle Bruna Leal de Oliveira, Dra LÍlian Walsh Keller e Dra Juliana Nogueira Martins Rodrigues.

Agradeço ao Prof. Dr. Manoel Armando Azevedo dos Santos, Prof. Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, a Dra. Silvana R. Favoretto Lazarini, Dra. Viviane Fongaro Botosso e a pesquisadora Adélia Hiroko Nagamori Kawamoto, pelos conselhos e amizade. Bem como a Maria Jacinta de Faria e a Aziz Orro Medina pela grande amizade que formamos.

Registro a minha gratidão a todos os amigos que fiz no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do ICB – USP pela amizade e companheirismo em todas os momentos de convívio: Andréa Leal, Ariane do Carmo Lins Carvalho, Danila Vedovello, Eduardo Salustino Faro, Francisco Hernandes, Dra. Lourdes Rehder de Andrade Vaz de Lima, Dra Maria Luiza Barbosa, Maria Paula (Misa), Angélica Cristine de Almeida Campos, Dra Cláudia Filoni, Dra Claudia Trigo Pedroso de Moraes, Dra Dyana Alves Henriques, Fábio Carmona de Jesus Maués, Felipe Alves Moraes, Luiz Gustavo Bentim Góes, Jean Paulo Lopes Zukurov, *Larissa Cuba* Lins, Lilia Mara Mesquita Dutra, Patrícia Alves Ramos Bosso e Thereza Silva Souza.

Agradeço também aos Profs. Drs. integrantes da banca de exame de qualificação que foram muito solícitos comigo: Prof. Dr. Willy Beçak, Prof. Dr. Saulo Duarte Passos e Prof. Dr. José Antônio Jerez.

Ao Dr. Robert G. Webster e David Walker por terem me recebido tão bem no “St. Jude’s Children’s Research Hospital” de Memphis, nos Estados Unidos da América.

A presidente do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia Prof. Dra. Ana Clara Guerrini Schenberg e aos secretários (a) Eliane de Araujo Gouveia, Fábiana Reis Vilanova e Marcos Aurélio Nogueira Lourenço.

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

Sou grato a FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e reserva técnica.

“Não sei quem sou nem sei por que motivo
Vim ao mundo e o que nele vim fazer.
Sei que penso e, portanto, sei que vivo,
Neste anseio instintivo de viver.

Porque procedo do homem primitivo,
Há rugidos de fera no meu ser.
Bom e mau, triste e alegre, humilde e altivo,
Não me posso, a mim mesmo, compreender.

Pois se, de mim, não sei causa e destino,
Que dos outros, do mundo, saberei?
Que definir, se a mim não me defino?

E sigo, ao léu da vida, a ignota lei,
Descrendo das verdades que imagino
E acreditando em tudo o que não sei.”

Bastos Tigre

Resumo

Golono MA. Epidemiologia e caracterização molecular de vírus da Influenza em aves residentes e migratórias no Brasil [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

Os vírus da influenza aviária têm provocado epidemias e pandemias gripais em seres humanos através dos tempos, a pandemia mais devastadora que se tem notícia, a gripe espanhola em 1918, teve sua origem no vírus aviário do tipo A subtipo H1N1. Em 1997-1998 dezoito pessoas foram infectadas com o vírus aviário tipo A subtipo H5N1, na cidade de Hong - Kong, seis pessoas foram a óbito. A origem do H5N1 recai sobre as aves selvagens que teriam infectado populações de aves domésticas. Em apenas 3 dias 1,5 milhões de aves em granjas morreram ou foram sacrificadas, 100% da população das aves comerciais de Hong-Kong. Devido às aves selvagens, principalmente os Anseriformes, serem o reservatório natural de todos os subtipos da influenza A, e pela possibilidade destes vírus causarem prejuízos econômicos e infectarem seres humanos, é que se faz necessário a execução do monitoramento de aves silvícolas e domésticas. Através do monitoramento poderemos obter dados referentes aos subtipos prevalentes nas populações aviárias, suas características patogênicas e antigênicas. Apesar de existir programas de monitoramento contínuo de aves selvagens na Europa, Estados Unidos da América, Canadá, Japão entre outros países, pouco foi feito no Brasil.

Foram coletadas amostras de 1323 aves distribuídas em todas as regiões do Brasil no espaço de 3 anos. As amostras foram subdivididas em três grupos: Swabs cloacais, swabs orais e amostras de sangue para a obtenção de soro.

Utilizamos nesta tese amostras coletadas de 671 aves. Estas amostras foram testadas por meio das técnicas de GeneScan, PCR em tempo real e RT-PCR e Duplex Nested-PCR com detecção em gel de agarose.

Obtivemos 18 amostras positivas pelas técnicas moleculares: 842, 974, 975, 1039, 1755, 1803, 1820, 1835, 1850, 2395, 2408, 2409, 2410, 2412, 2413, 2484, 2486 e 2527.

Testes moleculares foram feitos no intuito de melhorar a obtenção de RNA viral de amostras clínicas.

Palavras-chave: Influenza aviária. Vigilância Epidemiológica. Caracterização molecular.

Abstract

Golono MA. Epidemiology and molecular characterization of influenza virus in migratory and resident birds in Brazil [thesis]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2009.

The avian influenza virus has caused epidemics and pandemics flu in humans through the ages, the most devastating pandemic that we know, the Spanish flu in 1918, had its origin in the avian virus type A subtype H1N1. In 1997-1998, 18 people were infected with the avian virus type A subtype H5N1 in the city of Hong - Kong, 6 people died. The origin of the H5N1 rests on the wild birds that have infected domestic poultry populations. In just 3 days of 1.5 million poultry birds died or were destroyed, 100% of the population of the poultry trade in Hong Kong. Because wild birds, especially Anseriformes, are the natural reservoir of all influenza A subtypes, and the possibility of these viruses cause economic losses and infecting humans, is that it is necessary to the implementation of monitoring wild and domestic birds. By monitoring we can obtain data on the subtypes prevalent in bird populations, their characteristics and pathogenic antigens. Although programs exist for continuous monitoring of wild birds in Europe, United States, Canada, Japan and other countries, little has been done in Brazil. Samples were collected from 1323 birds distributed in all regions of Brazil within 3 years. The samples were divided into three groups: cloacal swabs, oral swabs and blood samples to obtain serum. Used in this thesis samples collected from 671 birds. These samples were tested by GeneScan techniques, real-time PCR and RT-PCR and Nested Duplex PCR detection with gel electrophoresis.

We obtained 18 positive samples by molecular techniques: 842, 974, 975, 1039, 1755, 1803, 1820, 1835, 1850, 2395, 2408, 2409, 2410, 2412, 2413, 2484, 2486 and 2527. Molecular tests have been made in order to improve the achievement of viral RNA in clinical samples.

Keywords: Avian influenza. Surveillance. Molecular characterization.

Sumário

1	Introdução.....	12
2	Justificativa.....	27
3	Objetivos.....	29
4	Materiais e Métodos.....	30
4.1	Expedições para coleta de amostras.....	30
4.2	Coleta de amostras.....	36
4.3	Extração de RNA das amostras virais.....	38
4.4	Reação de transc. Rev. com Iniciador Randômico.....	38
4.5	Reações de Duplex Nested-PCR.....	38
4.6	Eletroforese em Gel de Agarose.....	39
4.7	PCR em tempo real.....	39
4.8	PCR para a Detecção via Genescan.....	40
4.9	Técnica de GeneScan.....	41
4.10	Determinação de sequência de nucleotídeos.....	42
4.11	Edição e análise das sequências obtidas.....	42
5	Aperfeiçoamento das Técnicas de RT e PCR.....	43
5.1	Extração de RNA.....	43
5.2	Transcrição reversa com um ou dois Inic.....	43
5.3	PCR com cDNA com um, dois ou inic. Rand.....	44
5.4	Melhor. PCR. Oxalato amônia tetrametilada.....	45
5.5	PCR, obtenção de apenas um produto.....	46
5.6	Design de iniciadores modificados.....	46
6	Determinação do Subtipo da Hemaglutinina.....	47
6.1	PCR para a amplificação de HA inteira.....	47
7	Resultados.....	48
7.1	Detecção viral por PCR em tempo real.....	48
7.2	Detecção viral através de GeneScan.....	49
7.3	Duplex Nested-PCR e RT-PCR tradicional.....	50
7.4	Alinhamento das sequências.....	53
7.5	Pesquisa das sequências no "Genbank".....	54
8	Aperfeiçoamento das Técnicas de RT e PCR.....	54
8.1	PCR, cDNA com um, dois ou iniciadores randômicos.....	54

8.2 Aperfeiçoamento de PCR Oxalato de amônia tetrametil.....	55
8.3 PCR, otimização para a obtenção de apenas um produto...	55
9 Discussão.....	57
10 Conclusão.....	66
Referências Bibliográficas.....	67
Apêndices.....	73

1 Introdução

A gripe, em seres humanos, é uma doença respiratória aguda causada pelos vírus da influenza. Apesar de registros de epidemias e pandemias associadas com o vírus da influenza existirem desde 412 a.C., somente em 1933 foi pela primeira vez isolado. Este vírus, hoje classificado como sendo do tipo A, foi isolado em Londres, após a ocorrência de uma epidemia. Em 1940 foi descoberta a existência do tipo B e em 1950 o vírus da influenza do tipo C foi isolado (Hilleman, 2002). Destes tipos virais, somente o tipo A é capaz de infectar naturalmente animais e de gerar pandemias na população humana. Os tipos B e C infectam apenas pessoas. Somente o tipo B tem a capacidade de provocar epidemias, o tipo C causa apenas sintomas subclínicos.

No século XX, quatro pandemias acometeram o mundo e ocorreram nos anos 1918, 1957, 1968 e 1977 (Capua e Alexander, 2002).

A pandemia de 1918, também denominada gripe espanhola, assolou o mundo, foi a mais grave das pandemias que se tem notícia, matou mais de 20 milhões de pessoas em todo o planeta. No entanto, devido à falta de registros em muitos países durante a pandemia, pesquisadores e historiadores relatam que esse número pode ter ultrapassado o montante de 40 ou 50 milhões de mortos (Kuszewski e Brydak, 2000; Potter, 2001).

A pandemia de 1957 (“gripe asiática”) e a pandemia de 1968 (“gripe de Hong Kong”) mataram juntas mais de 1,5 milhões de pessoas. Essas pandemias causaram danos estimados de 32 bilhões de dólares à economia mundial, principalmente pela perda de produtividade, despesas com medicamentos e internações (World Health Organization (WHO) Influenza Fact Sheet 211, 1999).

Em 1977 o vírus da influenza (gripe Russa) infectou principalmente crianças e jovens, sendo as pessoas com mais de 50 anos pouco afetadas. Esta pandemia atingiu mais de 50% das crianças em idade escolar em todo o globo, no entanto, não foi responsável por altas taxas de mortalidade (Laver e Garman, 2002; Cox e Subbarao 2000).

Atualmente estamos passando por um período pandêmico. Provocada pelo vírus da influenza do tipo A subtipo H1N1, é a primeira pandemia do século XXI. Dia 11 de junho de 2009 a OMS elevou o alerta pandêmico de 5 para 6, o que caracteriza, segundo seus critérios, que a pandemia está em andamento. A fase 6 ocorre quando um determinado vírus se dissemina por pelo menos duas regionais da OMS (WHO 2009d). Com a propagação do vírus pandêmico, muitos países deixaram de fazer diagnósticos em pacientes com quadro respiratório leve ou moderado, concentrando os esforços nos

pacientes com quadro grave ou nos pacientes pertencentes aos grupos de risco. Portanto, segundo o último boletim epidemiológico divulgado pela OMS (WHO, 2009e) no dia 13 de novembro, consta que houve mais de 503.536 casos confirmados de gripe suína no mundo com o total de mortes de no mínimo 6.260 pessoas. A região mais afetada é o grupo das Américas com pelo menos 190.765 casos confirmados e 4.512 óbitos.

No Brasil, a transmissão sustentada da gripe suína, ou gripe pandêmica, termo que os órgãos oficiais vêm utilizando, foi declarada no dia 16 de julho de 2009. O Brasil, como os demais países onde a gripe suína se disseminou está concentrando os esforços nos pacientes mais graves, ou seja, os pacientes que apresentaram síndrome respiratória aguda grave (SRAG), no último boletim do Ministério da Saúde com dados tabulados até o dia 10 de outubro (semana epidemiológica 40), o Brasil teve 17.219 casos de SRAG provocados pela gripe pandêmica com 1.368 óbitos (Ministério da Saúde (MS), 2009). Estado mais afetado em número de casos é o Paraná com 7.630 pacientes com SRAG provocado pelo H1N1 pandêmico, o estado com maior quantidade de óbitos é São Paulo com 432 mortes atribuídas a gripe suína. A 31ª semana epidemiológica (SE) foi a que teve maior incidência por 100 mil habitantes de SRAG no Brasil, a partir desta SE houve declínio contínuo de casos (Fig. 1).

Figura 1. Distribuição de SRAG por região e por semana epidemiológica (MS, 2009).

Apesar de todas as epidemias e pandemias terem infectado seres humanos, a influenza não está restrita a espécie humana e é capaz de causar debilidade ou mortalidade em várias outras espécies, entre elas os eqüinos, os suínos, as focas e baleias (Chambers et al., 1989), além de aves.

As aves aquáticas são os reservatórios naturais dos vírus da influenza com capacidade de gerar pandemias. Estes vírus são agrupados dentro de um mesmo tipo sorológico denominado de tipo A (Webster et al., 1992).

Os vírus da gripe pertencem à família Orthomyxoviridae, sendo os vírus do tipo A pertencentes ao gênero *Influenzavirus A* (Büchen-Osmond, 2003).

Os subtipos virais do tipo A são classificados de acordo com as características sorológicas de suas duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA). Foram descritos 16 subtipos de HA, denominados de H1, H2, H3 até H16 e 9 subtipos de NA, denominados de N1, N2, N3 até N9 (Webster et al., 1997; Fouchier et al., 2005).

Os isolados de influenza tipo A são denominados pelos subtipos de HA e NA que possuem, o local onde foram coletados e o ano, por ex. A/Hong Kong/03/68 (H3N2).

Os vírus da gripe, em aves aquáticas, normalmente não provocam doença ou sintomas nestes animais e se replicam preferencialmente em células do trato gastrointestinal (Webster et al., 1978). Em aves domésticas os vírus do tipo A podem ser divididos em dois grupos de acordo com sua habilidade de provocar doença e a gravidade dos sintomas que causam. Vírus da influenza altamente patogênicos para aves (HPAI, sigla em inglês para highly pathogenic avian influenza) podem exterminar uma criação ou granja de galinhas em 24 horas. Estes vírus estão restritos aos subtipos H5 e H7. Todos os outros subtipos causam apenas sintomas brandos e em sua maioria atacam o sistema respiratório e são designados como vírus pouco patogênicos para aves (LPAI, sigla em inglês para low pathogenic avian influenza). Apesar de as infecções virais do tipo LPAI serem brandas, não podem ser ignoradas do ponto de vista comercial, pois, podem provocar expressiva queda na produção de ovos no período em que as aves poedeiras fiquem debilitadas (Alexander, 2000).

Foram registrados por volta de 24 eventos de HPAI em todo o mundo no período de 45 anos compreendido no intervalo de 1959 a 2004, com milhões de aves domésticas indo a óbito ou sendo sacrificados e prejuízos na casa dos bilhões de dólares (Capua e Alexander, 2004).

Estudos ecológicos levantaram a hipótese de que todos os vírus da influenza do

tipo A encontrados em mamíferos são derivados dos reservatórios aviários (Webster et al., 1992).

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

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

O “drift” antigênico é gerado por mutações pontuais e cumulativas nos genes de HA e NA. A alteração de um único aminoácido em HA pode permitir ao vírus mutante escapar à neutralização dos anticorpos gerados em infecções anteriores e assim, provocar uma epidemia (Nakajima et al., 2000).

O “shift” antigênico pode ser definido como o aparecimento de um vírus da influenza A contendo um novo subtipo de HA ou de HA e NA na população, os quais são imunologicamente distintos dos vírus da influenza que circulavam anteriormente. O “shift” antigênico ocorre quando vírus de influenza animal, que normalmente infectam reservatórios aviários, são transmitidos para o homem. Evidências sugerem que o aparecimento de linhagens pandêmicas pode ocorrer por dois mecanismos distintos. O primeiro é derivado da natureza segmentada do genoma dos vírus influenza e se refere ao reagrupamento dos segmentos genômicos de vírus influenza humana e vírus influenza animal, durante a co-infecção de uma mesma célula hospedeira. Os suínos se destacam nesse contexto visto que possuem receptores celulares para vírus de origem aviária e humana (Cox e Subbarao, 2000). O segundo mecanismo para o surgimento de linhagens pandêmicas é a transmissão direta de uma linhagem animal para o homem (Cox e Subbarao, 2000).

O genoma viral do tipo A é composto de 8 segmentos de RNA de fita simples e de polaridade negativa (complementar ao RNA mensageiro). Cada segmento está associado à nucleoproteína NP (Klump et al., 1997) e a um complexo de polimerase viral (Brown, 2000).

Englobando estes complexos, há uma matriz protéica constituída por proteína M1, a qual é envolvida por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira (Braakman e

Anken, 2000). Duas glicoproteínas de superfície, codificadas pelo genoma viral, projetam-se através da bicamada lipídica, a HA e a NA. Ainda, uma terceira proteína, formadora de canais (M2), encontra-se inserida na bicamada lipídica (Fig. 2) (Mould et al., 2000).

Pelo menos 10 proteínas são codificadas pelos genomas do vírus da influenza A (Neumann et al., 2000) (Tabela 1).

No vírus tipo A, os segmentos 1, 2 e 3 codificam as proteínas PB2, PB1 e PA respectivamente. Estas proteínas compõem a polimerase viral, possuem atividade de transcriptase (Hay, 1998).

O segmento 4 codifica a hemaglutinina (HA). A HA é a glicoproteína de superfície viral mais imunogênica. A HA se liga ao receptor de ácido siálico existente na superfície celular e age na fusão da partícula viral com a membrana endossômica permitindo o acesso viral ao citoplasma celular (Skehel e Wiley, 2002).

A nucleoproteína NP é codificada pelo segmento 5. No núcleo, a NP liga-se ao RNA viral e o encapsida, estabilizando-o e protegendo-o da ação de RNases (Mena et al., 1999).

Tabela 1. Organização do genoma do vírus da influenza.

Genoma	Tamanho	Poli-peptídios	Moléculas
^aSegmento	RNA viral	Codificados Tipo A	por vírion
1	2341	PB2	30 - 60
2	2341	PB1	30 - 60
3	2233	PA	30 - 60
4	1778	HA	500
5	1565	NP	1000
6	1413	NA	100
7	1027	M1, M2	3000, 20 - 60 ^c
8	890	NS1, NS2 ^b	nd, 130 - 200

*a - Os segmentos de RNA são numerados de acordo com seus tamanhos decrescentes.

*b - Recentemente, NS2 recebeu o nome de NEP ("nuclear export protein").

*c - Quantidade de moléculas de M1 e M2 existentes em cada partícula respectivamente.

nd - Não determinado.

A neuraminidase (NA) é codificada pelo segmento 6. A NA tem a função de facilitar o acesso da partícula viral à superfície das células através da degradação de ácido siálico do muco extracelular e de auxiliar na dispersão dos vírus através da destruição dos receptores de HA da superfície celular, impedindo-as de serem imobilizadas.

O segmento número 7 dos vírus influenza tipo A codifica as proteínas M1 e M2. A M1 faz parte da matriz protéica, a qual forma uma camada elétron-densa logo abaixo do envelope viral (Brown, 2000). A M2 é uma proteína formadora de canais iônicos que tem a função de permitir a acidificação do interior dos vírions quando estes se encontram nos endossomos celulares favorecendo o "desempacotamento" viral (Hilleman, 2002).

Duas proteínas, NS1 e NS2 ou NEP, são codificadas pelo segmento 8. A NS1 é inibidora do processamento pós-transcricional de RNAm celular impedindo assim a síntese de proteínas antivirais (Chen e Krug, 2000). NS2 ou NEP tem a função de mediar a exportação nuclear dos RNAs do vírion (O'Neill et al., 1998).

A influenza é transmitida de uma pessoa para outra através de aerossóis. Quando as gotículas contendo os vírus são inaladas, esses entram em contato com o epitélio do trato respiratório (Nicholson, 1998). As partículas virais, através da HA, ligam-se a receptores de ácido siálico da superfície celular e, assim, o vírion é endocitado e liberado no citoplasma da célula hospedeira (Fig. 3). Após a entrada viral, os nucleocapsídeos migram para o núcleo da célula e as proteínas com atividade de polimerase iniciam a transcrição dos RNAs do vírion (vRNAs) em RNAs mensageiros (mRNAs) (Yewdell e García-Sastre, 2002). Compõem o complexo de transcriptase viral, as proteínas PB1, PB2 e PA. A polimerase PB2 inicia o processo de transcrição. A PB1 é responsável pelo processo de elongação do mRNA viral. A função da polimerase PA na transcrição primária ainda não é conhecida, no entanto este polipeptídeo é necessário para a transcrição e replicação do vRNA (Nakagawa et al., 1996).

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

Figura 2. Modelo estrutural do vírus da influenza do tipo A. Figura modificada de Kaiser, 2006.

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

Figura 3 - Ciclo de vida do vírus da influenza. Modificado de Itzstein 2007.

Os variantes do vírus da influenza aviária têm provocado epidemias e pandemias gripais em seres humanos através dos tempos, até mesmo a pandemia mais devastadora que se tem notícia, a gripe espanhola em 1918, teve sua origem no vírus aviário do tipo A subtipo H1N1 (Taubenberger et al., 2001). Em 1997-1998, dezoito pessoas foram infectadas com o vírus aviário tipo A subtipo H5N1, na cidade de Hong – Kong, onde seis pessoas foram a óbito. O vírus H5N1 não provocou uma epidemia ou pandemia devido a sua incapacidade de se transmitir de uma pessoa a outra. A gripe do frango como ficou conhecida, devido os vírus H5N1 serem transmitidos diretamente de frangos infectados a pessoas, é altamente patogênica para galinhas.

A origem do H5N1 recai sobre as aves selvagens que teriam infectado com este vírus a população de aves domésticas. Em apenas 3 dias 1,5 milhões de aves em granjas morreram ou foram sacrificadas, 100% da população das aves comerciais de Hong-

Kong (WHO, 2006). Em março de 1999 mais um subtipo relacionado à influenza aviária infectou pessoas em Hong Kong. Identificado como sendo do subtipo H9N2, causou apenas quadros brandos de gripe, no entanto este subtipo através de recombinação foi o doador de genes que codificam proteínas internas do vírus H5N1. Os vírus H9N2, também, não são capazes de serem transmitidos de uma pessoa para outra, sendo transmitidos apenas de aves domésticas diretamente para seres humanos (Katz, 2003). No início de 2003, na Holanda, o subtipo viral H7N7, de origem aviária, que ainda não havia sido encontrado em seres humanos, foi detectado em 89 pessoas e causou, na maioria dos infectados, um quadro de conjuntivite. No entanto, duas pessoas desenvolveram um quadro respiratório com sintomatologia característica de gripe e uma foi a óbito devido a complicações pulmonares (Fouchier et al., 2004).

Desde janeiro de 2003, uma segunda onda da doença se iniciou Em Hong-Kong, infectando três pessoas de uma mesma família e matando duas, desde então o H5N1 não parou de causar infecções em humanos (WHO, 2009a). Até o dia 24 de setembro de 2009 (última atualização da Organização Mundial da Saúde) já haviam sido contabilizados 442 casos de infecção por H5N1 com 262 mortes, taxa de mortalidade de 59,3%. Até o momento o H5N1 causou doença em pessoas de 15 países (WHO, 2009b) (Fig. 4).

Atualmente, os vírus do subtipo H5N1 são endêmicos na Ásia e na África, em especial no Egito. Estes vírus encontraram um nicho ecológico em aves domésticas e apesar de ser de difícil transmissão para seres humanos, sua exposição constante aos trabalhadores rurais e nos mercados asiáticos e africanos eleva a chance de ocorrer uma adaptação viral aos humanos e assim, se tornaram mais eficientes na transmissão viral de pessoa para pessoa podendo dar início a uma nova pandemia. Devido a isso, é importante o monitoramento de aves selvagens e domésticas para a contenção dos focos aviários da doença. A Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) divulga periodicamente boletins sobre a gripe o H5N1 em aves. Desde o final de 2003 até a última atualização da OIE em 05 de novembro de 2009, o vírus H5N1 foi encontrado em aves domésticas de 50 países, os mais afetados são Vietnã, Tailândia e Egito com 2.545, 1.141 e 1.084 surtos de gripe aviária respectivamente (Fig. 5) (OIE, 2009).

Figura 4: Casos humanos confirmados desde 2003 até 24 de setembro de 2009 (última atualização da OMS). Modificado de WHO, 2009c.

Além do problema de saúde, vírus da influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI), podem provocar grandes prejuízos econômicos. Quando um vírus HPAI é encontrado em uma granja, todo o plantel deve ser sacrificado para a contenção do surto, com isso, as exportações de carne e outros insumos derivados de aves de granja são completamente paralisadas. Dentro do “ranking” dos maiores produtores de frangos o Brasil está na terceira colocação, atrás apenas dos Estados Unidos da América e da China (Fig. 6), no entanto, no “ranking” dos exportadores, o Brasil ocupa a primeira posição sendo o maior exportador de carne de frango do mundo desde 2004, responsável por 43,4% de toda a exportação mundial, dados tabulados até o ano de 2008 pela Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF) (Fig. 7).

Figura 5. Mapa de surtos em aves domésticas e silvestres no período de 2005 a 05 de novembro de 2009. Os círculos vermelhos indicam a localidade onde existem surtos em andamentos em aves domésticas, os círculos azuis mostram as localidades onde ocorreram surtos em aves domésticas, o triângulo amarelo mostra surtos em andamento em aves silvestres, os triângulos verdes, são os surtos que ocorreram em aves selvagens. Em bege está marcada a região onde não existem dados de surtos provocados por vírus aviário de alta patogenicidade.

Figura 6. Produção de carne de frango em milhares de toneladas (ABEF, 2008).

Figura 7. Exportação de carne de Frango em milhares de toneladas (ABEF, 2008).

Devido às aves selvagens serem o reservatório natural de todos os subtipos da influenza do tipo A e aliada a possibilidade destes vírus serem transmitidos às aves comerciais, causar prejuízos econômicos e serem transmitidos para seres humanos, é necessário que seja feito um monitoramento em aves selvagens e comerciais. Através do monitoramento de aves selvagens poderemos obter dados dos subtipos prevalentes nas populações aviárias, suas características patogênicas e antigênicas. Além disso, o monitoramento destas aves é essencial para a identificação de subtipos com capacidade de gerar epidemias ou até mesmo uma pandemia (Soares et al., 2005). Através deste monitoramento é possível formar painéis de amostras de referência que poderão ser utilizadas na fabricação de vacinas para eventuais epidemias ou pandemia causadas na população por vírus de origem aviária. Apesar de existir programas de monitoramento contínuo de aves selvagens na Europa, Estados Unidos da América, Canadá, Japão e os países asiáticos que possuem casos originados pelos vírus aviário H5N1, pouco foi feito no Brasil. O monitoramento das aves selvagens deve incluir as aves migratórias, que em sua rota de migração passam por vários países do mundo e, assim, podem transportar vírus da influenza e infectar populações de aves residentes e vice-versa (Fig. 8). Apesar de cerca de 90 espécies de aves de 12 ordens diferentes serem portadoras de vírus da influenza ou suscetíveis às infecções causadas pelo vírus da gripe, apresentando sintomas ou não, a maior variedade de subtipos e a grande maioria de isolados foram obtidos de aves aquáticas da ordem dos Anseriformes, que compreende patos, marrecos, gansos e outros (Alexander, 2000).

Muitas aves que procriam no Brasil, migram para outras localidades nos períodos de descanso reprodutivo. Isto favorece a disseminação de vírus da gripe para várias populações não migratórias do Brasil e países vizinhos. Várias aves que procriam em outros países, também, migram para o Brasil em busca de alimento. Foram registradas, no Brasil, 152 espécies de aves que visitam o país regularmente em bandos ou são vistas esporadicamente em nosso território, sendo que 101 espécies são de aves aquáticas, o principal reservatório de vírus da influenza. Do total das 152 espécies de aves visitantes, ou seja, que não se reproduzem em nosso país, 91 são oriundas do hemisfério Norte, sendo 54 espécies aquáticas. Outras 61 espécies chegam ao Brasil provenientes de países do hemisfério Sul e da Antártica, incluindo 46 espécies aquáticas (Sick, 2001). A rota migratória do Atlântico e a rota do Mississippi são as principais rotas migratórias que chegam ao Brasil. À rota do atlântico liga a região ártica do mundo ao litoral brasileiro e a rota do Mississippi passa pela mesma região ártica e segue em direção ao interior do país.

Fig. 8. Principais rotas das aves migratórias. Modificado de Boere e Stroud, 2006.

O vírus da influenza replica no trato intestinal das aves, assim as aves selvagens migratórias podem infectar através das fezes a água ou o alimento utilizado em granjas de aves domésticas e provocar a morte ou queda na produção de ovos (Webster et al., 1997). Além disso, as aves selvagens podem infectar suínos que serviriam de intermediários entre os vírus aviários e humanos.

As células suínas possuem receptores de ácido siálico característicos da influenza aviária (NeuAc α 2,3Gal) e humana (NeuAc α 2,6Gal). Com isso vírus de aves podem infectar suínos e durante o processo de replicação viral se adaptar aos receptores humanos e adquirir a capacidade de infectar pessoas. As células de suínos quando co-infectadas por vírus aviários e humanos podem servir para o rearranjo dos segmentos genômicos, durante o processo de montagem da partícula viral e gerar um vírus híbrido. Este vírus híbrido pode ser capaz de provocar uma epidemia ou pandemia na população humana através do fenômeno de shift. Esta é a hipótese para explicar o que pode ter ocorrido na pandemia de 1918 (Fig. 9) (Webster et al., 1992; Zambon, 1999).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) projeta uma pandemia originada pelo subtipo H5N1 que pode afetar entre 20 e 50% da população mundial com a quantidade de mortes entre 2 e 7,4 milhões de pessoas. A expansão de uma pandemia não pode ser impedida, mas é possível reduzir seu impacto, caso o país esteja preparado e tenha um plano de emergência (WHO, 2005).

A - Rearranjo em Suínos

B - Adaptação em Suínos

C - Transmissão Direta ao Ser Humano

Figura 9. Modelos de geração de cepas de vírus da influenza pandêmicas em suínos. A - modelo clássico de rearranjo entre vírus aviários ($\alpha 2,3$) e humanos ($\alpha 2,6$) mostrando a incorporação de um gene aviário no vírus da influenza humana. B - Neste modelo o vírus da influenza aviária adquire a capacidade de infectar seres humanos devido sua adaptação ao receptor celular humano. Esta mudança é mediada por processos de drift no gene de HA. C - modelo de transmissão direta de vírus aviários para seres humanos devido a HA ter a capacidade de se ligar em ambos os receptores. Modificado de Horimoto e Kawaoka, 2001.

2 Justificativa

O monitoramento das aves selvagens, principalmente das aves aquáticas, é de fundamental importância em nosso país, não só pelas implicações econômicas, mais fundamentalmente devido a implicações na saúde da população humana e pela necessidade de obtermos informações sobre os subtipos virais que estão circulando em nossas aves silvestres.

Pelo exposto, fica evidente a importância de um modelo de detecção e subtipagem de vírus da influenza aviária em circulação no nosso meio, principalmente por trazer uma resposta ao serviço de vigilância epidemiológica do Brasil e permita uma resposta dos agentes de saúde em termos individuais ou coletivos.

A utilização de RT-PCR (reações de transcrição reversa seguida de reações em cadeia da polimerase) para a detecção dos vírus da influenza aviária pode ser bastante útil e eficiente para o monitoramento destes vírus. Estas técnicas são mais rápidas, sensíveis e específicas que métodos baseados em isolamento viral em cultura de células ou em ovo embrionado e em métodos baseados em imunoenaios (Koenig et al., 2003). A RT-PCR é mais sensível para amostras estocadas de vírus da influenza A na ordem de 10^3 em relação ao cultivo viral e entre 10^6 e 10^7 em relação ao ensaio de ELISA (Steininger et al., 2002). Ensaio moleculares podem ser utilizados para a detecção, para subtipagem e para a obtenção de informações da sequência de nucleotídeos de qualquer segmento gênico dos vírus da influenza A que é bastante útil para a compreensão filogenética e epizootica destes vírus. Além disso, RT-PCR requer pequenas quantidades de RNA viral e pode ser feito a partir de amostras clínicas, de cultivados, de material de biópsia e até mesmo de guano.

Em 2004 defendi a dissertação de mestrado intitulada de: “Variantes Moleculares do Vírus Influenza” pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Genética) do Instituto de Biociências da USP. Portanto no mestrado, mesmo trabalhando com vírus da influenza humana sazonal, adquiri conhecimentos para o desenvolvimento desta tese de doutorado. Além dos conhecimentos teóricos, também adquiri experiência com técnicas moleculares que formam a base experimental desta tese.

Portanto, este trabalho visa à detecção de vírus da influenza A em amostras coletadas de aves residentes e migratórias nas regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Sul do Brasil e a obtenção de dados de sequência de nucleotídeos dos segmentos genômicos 4

e 6, responsável pela codificação da hemaglutinina e da neuraminidase respectivamente. Através dos dados de sequência de nucleotídeos será possível determinar os subtipos de HA e NA dos vírus existentes nas amostras coletadas e fazer estudos filogenéticos.

3 Objetivos

1) Otimização de técnicas moleculares para a detecção de vírus da influenza, em material oral e cloacal coletado de aves de interesse epidemiológico. Esta otimização visa à adequação de um método a ser utilizado em trabalhos futuros como parte de um projeto de monitoramento de gripe aviária continuado.

2) Detecção de vírus da influenza do tipo A em aves residentes e migratórias, por meio das técnicas moleculares de transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase, em amostras de zaragatoas coletadas de aves capturadas em regiões do território nacional sabidamente de confluência migratória.

3) Determinação dos subtipos de influenza A das amostras positivas para o conhecimento do pool viral existente no Brasil e para a comparação com vírus detectados em outros países do globo.

4 Materiais e Métodos

4.1 Expedições para coleta de amostras

Para a realização deste trabalho foram realizadas duas expedições com a duração de um mês e outras cinco viagens para coleta de amostras (Fig. 10 e 11).

Para a coleta de amostras em várias regiões do país foram adquiridos dois veículos, uma Land Rover Defender 110 equipada com itens para o trabalho de campo e o acesso a regiões com estradas precárias e uma F350 4x4 cabine dupla e chassi estendido e também equipada para rodar em regiões de difícil acesso. Ainda, esta caminhonete é equipada com um laboratório móvel (Fig. 10A). Este laboratório móvel foi utilizado principalmente para o processamento das amostras de sangue *in loco*. Faz parte da estrutura de campo um barco de alumínio e motor para chegarmos a populações ribeirinhas, além de outros equipamentos necessários para a captura das aves silvestres ou domésticas e para coleta, armazenagem e processamento das amostras.

As regiões para a coleta de amostras foram escolhidas devido ao grande número de aves migrantes e imigrantes existente nestas áreas. A região Norte, especialmente o Pará é um ponto de parada de aves migratórias. Os municípios amostrados no Estado do Maranhão possuem uma área extensa que é alagada todos os anos formando um pantanal, o que atrai muitas aves. A coroa do Avião e os municípios visitados de Santa Catarina pertencem a importantes áreas e concentração de aves marinhas e estão na rota migratória do atlântico. Decidimos também coletar amostras de pingüins dos aquários de Santos e do Guarujá, pois estas aves também são migratórias, apesar de chegarem ao Brasil apenas de modo acidental e de modo geral doentes.

A primeira expedição foi realizada entre 03 e 30 de julho de 2005. Neste período percorremos cerca de 9 mil quilômetros entre a cidade de São Paulo, Monte Negro em Rondônia (distante 248 quilômetros de Porto Velho), Ilha do Mosqueiro (distrito de Belém distante 85 quilômetros da mesma) e Marabitanas que pertence ao município de São Caetano de Odivelas no Pará, que dista 110 quilômetros da capital.

Em Monte Negro a Universidade de São Paulo (USP) possui um posto de pesquisas avançado, o Instituto de Ciências Biomédicas 5.

Durante esta expedição coletamos amostras de 36 espécimes de passeriformes, de 275 patos (*Cairina moschata*), de 34 perus (*Meliagres gallopavo*), e de 1 ave não identificada, totalizando amostras coletadas de 346 animais.

A segunda expedição com destino ao Pará ocorreu entre os dias 5 de Julho e 6 de Agosto de 2006. O trajeto percorrido por terra foi de 6.602 quilômetros. O primeiro destino foi o distrito de Marabitanas, município de São Caetano de Odivelas, onde ficamos até o dia 21 de julho de 2006. Chegamos a São Sebastião da Boa Vista, Ilha Marajó, dia 22 de julho depois de 9 horas de viagem em um barco de linha que partiu de Belém – PA.

Neste período coletamos amostras de 659 animais, sendo 530 de Patos (*Cairina moschata*), 95 galinhas (*Gallus gallus*), 29 peru (*Meliagres gallopavo*), 2 de galinha d'angola (*Numida meleagris*), 1 de garça (*Egretta thula*), 1 de maguari (*Ardea cocoi*) e 1 de gaivota (*Larus sp.*).

Ainda em 2006, mais precisamente nos dias 16 de outubro e 23 do mesmo mês, realizamos coletas de amostras de pingüins nos aquários de Santos e do Guarujá. Todos os pingüins foram da espécie *Spheniscus magellanicus* (pingüim-de-Magalhães). Os pingüins de Magalhães chegam ao Brasil de forma esporádica e em geral solitários. Foram coletadas, em dois dias de trabalho, amostras orais, cloacais e de sangue de 67 pingüins.

Foi realizada uma terceira viagem para o Estado do Pará no período de 27 de outubro a 04 de novembro de 2006. Foram coletadas amostras de 100 aves, 79 patos (*Cairina moschata*), 6 galinhas (*Gallus gallus*), 6 maçarico-pintado (*Actitis macularia*), 4 Trinta-Réis-Boreal (*Sterna hirundo*), 3 maçarico-rasteirinho (*Calidris pusilla*), 1 maçariquinho (*Calidris minutilla*) e 1 maçarico-de-papo-vermelho (*Calidris canutus*). Os municípios visitados foram: Breves localizado na Ilha do Marajó, e Bragança distante 220 quilômetros de Belém.

Foram realizadas coletas em Santa Catarina, no período de 16 a 20 de novembro de 2006. Os municípios visitados foram: Araranguá, Tijucas, Barra Velha e Navegantes, distantes 214, 50, 120 e 90 quilômetros de Florianópolis respectivamente.

Foram coletadas amostras de 50 aves, sendo 12 de patos (*Cairina moschata*), 10 de galinhas (*Gallus gallus*), 14 de anseriformes não identificados, 6 de perus (*Meliagres gallopavo*), 2 de galinhas d'angolas (*Numida meleagris*), 3 de talha-mar (*Rynchops niger*), 1 de maçarico-grande-de-perna-amarela (*Tringa melanoleuca*), 1 de quero-quero (*Vanellus chilensis*) e 1 de caminheiro-zumbidor (*Anthus lutescens*).

Durante o período de 10 a 20 de abril de 2007 foi realizada uma viagem para os municípios de São Bento, Bacurituba e Cajapió localizadas no Norte do Maranhão (Fig. 12) e outra viagem a Coroa do Avião que pertence ao município de Igarassu, região metropolitana de Recife – PE. São Bento, Bacurituba e Cajapió distam 94, 85 e 68 quilômetros da capital maranhense respectivamente. Estes municípios estão na região

conhecida como pantanal maranhense devido aos campos que são inundados periodicamente.

No Maranhão foram coletadas amostras de 74 animais: foram capturadas 44 marrecas-cabocla (*Dendrocygna autumnalis*), 18 irerês (*Dendrocygna viduata*), 4 pés-vermelho, 3 marrecas-toicinho (*Anas bahamensis*), 2 paturis-preta (*Netta erythrophthalma*), 2 frangos-d'água-comum (*Gallinula chloropus*) e 1 peru (*Melagres gallopavo*).

Em Pernambuco foram coletadas amostras de 27 maçaricos de espécies não identificadas.

No total foram coletadas amostras de 1323 animais. Sendo 981 amostras de Anseriformes (74,2%), 185 de Galliformes (14%), 67 de pingüins (5%), 39 de maçaricos (3%), 36 de passeriformes (2,7%) e 15 amostras de espécies diversas minoritárias ou não identificadas (1,1%).

Todas as coletas foram autorizadas pelo IBAMA, licença número 201/2006 – CGFAU e processo número 02027.002839/2005.

Figura 10. A - Veículo Ford 350 utilizado nas expedições. B - Situação comum em fundos de quintal no norte do Pará. C - Criação comercial de patos com acesso livre ao lago e a aves selvagens (círculo vermelho). D - Coletando amostra de sangue da asa de um pato. E - Coletando amostra oral de uma galinha d'angola. F - Laboratório de segurança nível 3+ utilizado para o processamento das amostras.

Figura 12 - Região norte do maranhão. Área alagada extensa e sazonal.

A – Marrecos selvagens, domesticados e mantidos cativos próximos a residência.

B – Anatídeos migratórios atraídos em grandes bandos devido à fartura alimentar.

C – Os anatídeos selvagens entram em contatos com aves domésticas. Três espécies selvagens se encontram na foto, *Dendrocygna Viduata* (irerê), *Dendrocygna autumnalis* (marreca cabocla) e *Cairina moschata* (pato selvagem) em conjunto com marrecos e patos domésticos.

D – Panorama da região onde foram realizadas as coletas. Extensa área alagada.

E – Abundância de plantas aquáticas atrai as aves silvestres.

4.2 Coleta de amostras.

As amostras de material cloacal e oral foram coletadas com auxílio de zaragotoas. Após a coleta, as amostras foram transportadas em meio Eagle contendo 1,0% de albumina bovina, 2.000 unidades de penicilina G, 2,5 µg de estreptomicina, 6 µg de gentamicina, 25 µg de fungisona e 20% de glicerina e também em Trizol (Invitrogen). Estas foram acondicionadas em tambores de nitrogênio líquido no momento da coleta em campo para o transporte até o laboratório, após as amostras foram transferidas para freezer - 70 °C.

O sangue foi coletado por venopunção e adicionado a solução anticoagulante de Alsever. O soro das amostras foi separado e transportado em balão de nitrogênio líquido a -196 °C até o manuseio laboratorial. A seguir o material foi estocado em freezer -70 °C.

Foram coletadas amostras de 1323 animais. As amostras orais e cloacais foram feitas em duplicatas, o soro também foi separado em duplicatas mais o hematócrito remanescente das amostras de sangue, perfaz, portanto, sete amostras de cada animal, totalizando 9.261 amostras obtidas.

As etapas básicas que foram seguidas neste trabalho estão no fluxograma abaixo (Fig. 13).

Figura 13. Fluxograma básico do trabalho desenvolvido.

4.3 Extração de RNA das amostras virais

As amostras estocadas em Trizol foram acrescidas de 20 µg de glicogênio livre de RNases no momento do descongelamento. Estas amostras foram homogeneizadas, seguindo-se incubação por 5 minutos a temperatura ambiente. Após foi adicionado 200 µL de clorofórmio (Merck) a mistura seguida de homogeneização por inversão do tubo, prosseguiu-se com incubação por 3 minutos a temperatura ambiente. A mistura foi centrifugada a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, e a precipitação do RNA foi feita a temperatura ambiente por 10 minutos após a adição de 500 µL de isopropanol (Merck). O precipitado foi coletado por centrifugação a 12.000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 75% (Synth). O RNA seco foi dissolvido em 40 µL de água livre de RNases. Foram extraídos o RNA de amostras coletadas de 1.192 animais.

4.4 Reação de transcrição reversa utilizando iniciadores randômicos

A transcrição reversa foi feita com a utilização do kit comercial High-Capacity cDNA Archive (applied Biosystems, cat. N° 4322171). O RNA (20 µL) extraído de cada amostra foi incubado por 10 minutos a 25 °C na presença de 50 pMoles de “random primers” e demais reagentes obtendo-se um tampão de reação de 50 mM de Tris-HCL (pH 8.3), 75 mM de KCL, 3 mM de MgCl₂, 10 mM de dithiothreitol (DTT), 25 U/µL da enzima multiscrbe RT, 1.5 mM de 25x cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP e dCTP) e água livre de RNases para um volume total de 40 µL. As reações foram incubadas por 10 minutos a 25 °C seguida de incubação a 37 °C por 120 minutos. O cDNA foi estocado em freezer com temperatura de -70 °C até sua utilização.

Foram feitas reação de transcrição reversa para amostras coletadas de 1.192 animais.

4.5 Reações de Duplex Nested-PCR para a detecção viral através de gel de agarose

Para essa reação foram utilizados dois conjuntos de iniciadores, um conjunto feito para o gene da polimerase ácida (PA) da influenza e outro conjunto para o gene codificador da matriz viral (M). Os mesmos genes alvos foram utilizados para a segunda reação de

PCR, no entanto com a sequência do iniciador mais interna que os utilizados na primeira reação de PCR.

A amplificação foi realizada a partir de 10 µL de cDNA acrescido de 20 mM de Tris-HCL (pH 8.4), 50 mM de KCL, 1,5 mM de MgCl₂, 25 pMoles dos primers PA-18 e PA-689R e M-745 e M-970R, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 10 mM de cada dDNTTP e água ultra pura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato). O segundo PCR foi feito do mesmo modo com a exceção dos iniciadores e da concentração dos mesmos que foi de 10 pMoles. Os iniciadores da segunda reação de PCR foram o PA-61 e PA-611R e M-795 e M-952R.

As amostras foram amplificadas no termociclador BioRad DNA Thermocycler (BioRad). O programa de ciclagem consistiu de 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 54 °C, 1 minuto a 72 °C, e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C. O tamanho das bandas esperado ao final é de 550 pares de bases para o gene codificador da PA e de 157 pares de bases para o gene da matriz viral.

Infelizmente, devido o protocolo ainda não ter sido publicado, não me foi permitido conhecer a sequência destes iniciadores.

4.6 Eletroforese em gel de agarose

Um volume de 15 µL de produto foi adicionado a 3 µL de corante para amostra 6X (azul de bromofenol 0,25% e ficol tipo 400 15%), seguindo-se análise por eletroforese horizontal em gel de agarose 1.2% (Invitrogen Life Technologies), em tampão 1X TAE (40 mM Tris-acetato pH 8,0, 1 mM EDTA). Os géis de agarose foram corados com brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/mL (Invitrogen Life Technologies). Após a corrida, as bandas foram visualizadas por iluminação com luz ultravioleta e o gel foi fotografado.

Foram submetidas à eletroforese amostras coletadas de 203 animais.

4.7 PCR em tempo real.

Para este teste foi utilizado o “kit de detecção TaqMan Influenza A/H5 versão 1.0” (Applied Biosystems). Este kit faz a transcrição reversa e o PCR em um único passo. Cada reação foi feita de acordo com as instruções do fabricante que consiste nas concentrações finais de dATP, dCTP e dGTP de 300 µL, concentração final de dUTP de

600 µL, *rTth* polimerase na concentração de 0,1 U/µL, AmpErase UNG 0,01 U/µL, 450 nM de iniciadores e 200 nM de sonda e 10 µL de RNA extraído. O volume total da reação é de 50 µL. Para cada amostra é feita duas reações, uma para a detecção de vírus da influenza do tipo A e outra para a detecção do subtipo H5. Cada reação utiliza as mesmas concentrações citadas, diferindo apenas na sequência do iniciador e da sonda. O kit contém, ainda, um controle positivo para o tipo A, um controle para o subtipo H5 e um controle interno de reação. Os controles são utilizados na concentração de 1 fg por reação. O programa de ciclagem consiste em um passo de 1 minuto a 72 °C, um passo de 50 °C por 2 minutos, um ciclo de 30 minutos a 60 °C, um passo a 95 °C por 5 minutos e quarenta ciclos de vinte segundos 94 °C e 1 minuto a 58 °C. Para cada lote de reação foi feito um controle positivo para o tipo A, um para o subtipo H5 e um controle negativo. Além destes controles, cada reação foi feita com um controle interno.

Foram testadas amostras coletadas de 100 animais em um teste piloto.

4.8 Reações de PCR para a detecção viral através de GeneScan

A amplificação foi realizada a partir de 5 µL de cDNA acrescido de 20 mM de Tris-HCL (pH 8.4), 50 mM de KCL, 1,5 mM de MgCl₂, 25 pMoles dos primers FluA-F1 marcado com FAM (ctaagggtttcaccgaaga) e FluA-R1 (cccattctcattactgcttc) (Claas e col. 1992) 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Biotools), 10 mM de cada dNTP e água ultra pura tratada com DEPC (dietil pirocarbonato). As sequências alvo para os primers FluAF1 e FluA-R1 foi uma região conservada, do segmento genômico 8 (NS), para todos os subtipos virais do tipo A (Fig. 14). As amostras foram amplificadas no termociclador GeneAMP PCR system 9700 (Applied Biosystems). O programa de ciclagem consistiu de 40 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 54 °C, 1 minuto a 72 °C, e um ciclo final de 5 minutos a 72 °C.

```

ATGGATTCCAACACTGTGTCAAGTTTCCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATATCCGGAAACAAGTTGTAG
ACCAAGAACTGAGTGATGCCCCATTCCCTTGATCGGCTTCGCCGAGATCAGAGGTCCCTAAGGGGAAGAGG
CAATACTCTCGGTCTAGACATCAAAGCAGCCACCCATGTTGGAAAGCAAATTGTAGAAAAGATTCTGAAA
GAAGAATCTGATGAGGCACTTAAATGACCATGGTCTCCACACCTGCTTCGCGATACATAACTGACATGA
CTATTGAGGAATTGTCAAGAACTGGTTCATGCTAATGCCAAGCAGAAAATGGAAGGACCTCTTTGCAT
CAGAATGGACCAGGCAATCATGGAGAAAAACATCATATTGAAAGCGAATTTAGTGTGATTTTTGACCGA
CTAGAGACCATAGTATTACTAAGGGCTTTACCCGAAGAGGGAGCAATTGTTGGCGAAATCTCACCATTGC
FluA-F1 →
CTTCTTTTCCAGGACATACTATTGAGGATGTCAAAAATGCAATTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATG
GAATGATAACACAGTTCGAGTCTCTAAAAATCTACAGAGATTGCTTGGAGGAAGCAGTAATGAGAATGGG
← FluA-R1
GGATCTCCACTTACTCCAAAACAGAAACGGGAAATGGCGAGAACAGCTAGGTCAAAAGTTTGAAGAGATA
AGATGGCTAATTGAAGAAGTGAGACACAGATTAAAAACAACCTGAAAATAGCTTTGAACAAATAACATTCA
TGCAAGCATTACAACCTGCTGTTTGAAGTGGAACAGGAGATAAGAAGTTTCTCATTTTCAGCTTATTTAATG
ATAAAAA

```

Figura 14. Sequência completa do gene NS (A/New York/3487/2009(H3N2)), com a região complementar ao iniciador em negrito. A seta indica a direção de síntese dos iniciadores. Produto esperado no tamanho de 192 pares de bases.

4.9 Técnica de GeneScan

Os produtos de PCR foram analisados utilizando o sequenciador automático de DNA “ABI Prisma modelo 310” (Applied Biosystems) através da detecção do primers marcados com fluorescência (FAM) que foram incorporados aos produtos. Para esta detecção utilizou-se o programa GeneScan. O tamanho do fragmento esperado para Influenza tipo A é de 192 pares de bases.

Para a análise foi utilizado 1 µL do produto do PCR acrescido de 12 µL de formamida deionizada e 0,5 µL de peso molecular marcado (GeneScan 500 TM Rox – Applied Biosystems). A mistura foi denaturada a 95 °C por 3 minutos e imediatamente resfriadas em gelo. O material foi submetido a uma eletroforese pelo ABI 310 através de seu capilar preenchido com o polímero POP-4 (Applied Biosystems). A corrida eletroforética foi de 30 minutos a uma temperatura de 60 °C. Os fluoróforos incorporados no produto de PCR e no peso molecular foram excitados por um feixe de laser e sua

luminescência capturada por uma câmera digital. O resultado foi apresentado na tela de um computador ligado ao ABI 310 na forma de eletroferogramas.

Através da técnica de GeneScan, foram testadas amostras coletadas de 368 animais.

4.10 Reação de determinação de sequência de nucleotídeos

Para a reação de determinação de seqüências de nucleotídeos foram utilizados 3.2 pmoles de cada iniciador, 2 µL de “BigDye terminator cycle sequencing kit 3.0” (Applied Biosystems Inc), 6 µL de tampão “Save Money” (200mM de Tris-HCl pH 9 e 5mM de MgCl₂), 30 a 100 pmoles de produto de "PCR" e, água deionizada para completar o volume final de 20 µL. Os iniciadores utilizados foram os mesmos empregados no PCR para a detecção viral através de GeneScan, com a exceção de que o primer FluA-F1 que não estava marcado com FAM. Para cada amostra foram feitas quatro reações de seqüenciamento, duas reações utilizando iniciadores senso e duas com iniciadores anti-senso. As reações foram realizadas no termociclador "Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2400". O programa de ciclagem consistiu de 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 15 segundos a 50 °C e 4 minutos a 72 °C.

Os produtos das reações de determinação da seqüência de nucleotídeos foram purificados em colunas do kit "DyeEx 2.0 Spin Kit" (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante, seguindo-se secagem a vácuo por 30 minutos. As amostras purificadas foram ressuspendidas em 5 µL de formamida Hi-Di e denaturadas a 95 °C por 5 minutos e submetidas à eletroforese pelo seqüenciador automático ABI Prism 3100 através de seu capilar preenchido com o polímero POP-6 (Applied Biosystems).

4.11 Edição e análise das seqüências obtidas

As quatro seqüências de nucleotídeos obtidas para as amostras 2408, 2409, 2410, 2412 e 2413 foram alinhadas e editadas manualmente no programa de computador "Sequence Navigator" (versão 1.0.1 – Applied Biosystems). As seqüências editadas foram comparadas utilizando-se o programa de computador ClustalX 1.83 (Thompson e col., 1997) e traduzidas para aminoácidos pelo programa "BioEdit Sequence Alignment Editor" (versão 5.0.9) (Hall, 1999). Este último programa também foi utilizado para a apresentação gráfica do alinhamento.

5 Aperfeiçoamento das Técnicas de Transcrição Reversa e PCR

5.1 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita com o Kit “High Pure Viral RNA Extraction Kit” da Roche Inc. Seguiu-se com as recomendações do fabricante. Foram extraídos RNA de 200 µL de vírus cultivados em ovos embrionados. Para a realização dos testes foram utilizados vírus do tipo A do subtipo H5N3 e H7N1 de baixa patogenicidade. Também fizemos a extração de RNA do cultivado da amostra 35 em ovo embrionado. O volume final da extração foi de 50 µL.

5.2 Reação de transcrição reversa utilizando um ou dois Iniciadores

Inicialmente, para a reação de transcrição reversa, 9 µL do RNA extraído (como mostrado no item 1) de cada amostra foram desnaturados a 65 °C por 5 minutos na presença de 10 pMoles de cada iniciador denominados de Uni-12 (5' agcaaaagcagg 3') e Uni-13 (5' agtagaaacaagg 3') (Fig. 15) e 1 µL de 10 mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP e dCTP). Após a desnaturação, a mistura foi transferida para banho de gelo e, foram adicionados tampão para transcrição reversa, inibidor de RNase (RNAguard, Amersham Pharmacia Biotech Inc) e DTT para concentrações finais de 1X (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 1 U/µL e 10 mM respectivamente, considerando-se um volume final de reação de 20 µL. Seguiu-se incubação a 25 °C por 2 minutos e adição de 200 U de transcriptase reversa Superscript II RNase H- (200 U/µL, Invitrogen Life Technologies). A incubação a 25 °C foi prolongada por mais 10 minutos, seguindo-se aumento de temperatura para 42 °C pelo tempo restante da reação, ou seja, 50 minutos. Finalmente, a enzima foi inativada por calor a 70 °C durante 15 minutos.

Como a transcriptase reversa possui também a capacidade de polimerase, o produto final é a obtenção de cDNAs de dupla fita. Os iniciadores Uni-12 e Uni-13 além de serem específicos para influenza, o que diminui a produção de cDNAs indesejados, se ligam em todos os segmentos virais produzindo cDNAs de todos os 8 segmentos inteiros (Offringa e col., 2000, Rajakumar e col., 1990).

O mesmo procedimento descrito acima foi aplicado com a utilização de apenas um iniciador, neste caso, foi utilizado somente o Uni-12.

Figura 15. Esquema com a localização dos iniciadores Uni-12 e Uni-13 em um cDNA dupla fita contendo o gene codificador da hemaglutinina para o vírus da influenza.

* Representação no cDNA do sítio de clivagem da proteína.

5.3 PCR com cDNA sintetizado com um, dois ou iniciadores randômicos

Realizamos testes para verificação de qual metodologia de transcrição reversa apresentaria melhores resultados em relação à produção ou não de amplificadores, no intuito, de melhorar o rendimento e a recuperação de dados genéticos virais a partir de amostras clínicas.

A reação de PCR foi realizada num volume total de 50 μ L, utilizando-se de 2 μ L de cDNA (sem diluição, diluídos 10X, 100X e 1000x) ou do controle negativo de transcrição reversa e nas seguintes condições: 20 mM Tris-Cl pH 8,4, 50mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μ M de iniciador BM-HA-1 (5' tattcgtctcaggg**agcaaaagcagggg** 3') e Bm-NS-890R (5' atatcgtctcgtattag**tagaacaagggtgtttt** 3') (Hoffman e cols., 2001). e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies). A região em negrito dos iniciadores são complementares ao gene viral, a região 5' contém sítios de restrição para as endonucleases *Bsm*BI ou *Bsa*I. Estas seqüências aumentam a temperatura de anelamento e facilita a clonagem dos produtos de PCR.

O programa de ciclagem consistiu de 1 ciclo a 94 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos, seguidos de um ciclo a 72 °C por 7 minutos e 1 ciclo a 4 °C por tempo indeterminado.

O procedimento acima foi realizado utilizando-se cDNA sintetizados com iniciadores randômicos, sintetizados com o iniciador Uni-12 e sintetizados com os iniciadores Uni-12 e uni-13 em conjunto.

5.4 Melhoramento na reação de PCR. Oxalato de amônia tetrametilada

Devido à baixa carga viral e a existência de inibidores, em amostras coletadas de aves através de swabs orais e cloacais, se tornou importante, a utilização de técnicas ou aditivos nas reações de PCR para melhorar a produtividade das reações em cadeia da polimerase.

Dentre os vários aditivos existentes, o oxalato de amônia tetrametilada (SACHEM, inc.) se mostrou eficaz em testes realizados (Kovárová e Dráber, 2000).

A reação de PCR foi realizada num volume total de 50 µL, utilizando-se de 2 µL de cDNA (sem diluição, diluído 10, 100 e 1000X) ou do controle negativo de transcrição reversa e nas seguintes condições: 20 mM Tris-Cl pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 2 mM de oxalato de amônia tetrametilada, 0,1 µM de iniciador BM-HA-1 (5' **tattcgtctcagggagcaaaagcagggg** 3') e Bm-NS-890R (5' **atatcgtctcgtattagtagaaacaaggggtgtttt** 3') (Hoffman e cols., 2001). e 2,5 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies). A região em negrito dos iniciadores são complementares ao gene viral, a região 5' contém sítios de restrição para as endonucleases *Bsm*BI ou *Bsa*I. Estas seqüências aumentam a temperatura de anelamento e facilita a clonagem dos produtos de PCR.

O programa de ciclagem consistiu de 1 ciclo a 94 °C por 4 minutos, seguido de 40 ciclos de 94 °C por 20 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos, seguidos de um ciclo a 72 °C por 7 minutos e 1 ciclo a 4 °C por tempo indeterminado.

5.5 Reação de PCR otimizada para a obtenção de apenas um produto

Com a utilização dos primers Bm-HA1 e NS 890R são gerados dois produtos de PCR na mesma reação. O primeiro produto é o desejado, o gene codificador de HA inteiro (~1.800 pares de bases) e outro, indesejado, é o produto completo do gene codificador de NS (~890 pares de bases). Com isso, é necessário que se faça a purificação do produto desejado em gel de agarose antes que seja feito o sequenciamento de HA. Os dois produtos ocorrem porque as regiões conservadas 5' e 3' de HA e NS são quase idênticas, não sendo possível, através de uma reação de PCR sem modificações, a obtenção apenas do gene codificador da hemaglutinina.

Como a hemaglutinina possui 16 subtipos diferentes, é difícil desenhar um iniciador que seja específico somente para HA e evitar a amplificação conjunta de NS.

Para evitar a co- amplificação de HA e NS, desenhamos oligonucleotídeos pouco maiores que os BM-HA-1 e que o BM-NS-890R. As bases nitrogenadas adicionadas na região 3' do iniciador eram específicas somente para o gene de NS, o gene de NS é menos variável que HA, o que facilita a adição de bases sem que se perca especificidade. Além da adição de bases, adicionamos também um espaçador do tipo C3 ("C3 spacer"). O espaçador do tipo C3 tem a propriedade de bloquear a elongação feita pela polimerase. Com isso esperávamos bloquear a amplificação do gene de NS, sendo amplificado somente o gene codificante de HA. A reação de PCR seguiu a mesma metodologia descrita no item 3.4 com a exceção de que foram adicionados 10 pmol de cada iniciador modificado. Os iniciadores foram denominados de BM-HA-1-C3 e BM-NS-890R-C3, e suas seqüências são, 5' tat tcg tct cag gga gca aaa gca ggg tga caa a C3 spacer 3' e 5' ata tcg tct cgt att agt aga aac aag ggt gtt ttt ta C3 spacer 3' respectivamente.

5.6 Design de iniciadores modificados

Vários procedimentos de análise computacional foram adotados no auxílio para o design de "primers" que foram utilizados no intuito de bloquear a amplificação de NS em conjunto com HA. Como primeiro passo, fizemos o alinhamento de todas as seqüências completas de NS integrantes de vírus aviários disponíveis no banco de dados de influenza no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/FLU.html>). Foram obtidas no dia 23/04/2009 o total de 473 seqüências de nucleotídeos completas. O tamanho das seqüências de NS foi de 890 nucleotídeos. Para o alinhamento destas seqüências utilizamos

dois programas computacionais; o "BioEdit Sequence Alignment Editor" (versão 7.0.9.0) (Hall, 1999) e o Muscle "Multiple sequence comparison by log-expectation" (versão 3.6) (Edgar, 2004). Com os alinhamentos pudemos assim identificar que as regiões mais similares eram as regiões das extremidades 5' e 3' das seqüências de nucleotídeos de NS. Para identificarmos de corretamente as regiões mais conservadas em 5' e 3' selecionamos 100 nucleotídeos de ambas as regiões de todas as seqüências e fizemos novos alinhamentos. Dentro dessas análises desenhamos dois primers, Bm-HA-1-C3 e Bm-NS-890R-C3: 5' tat tcg tct cag gga gca aaa gca ggg tga caa a C3 spacer 3' e 5' ata tcg tct cgt att agt aga aac aag ggt gtt ttt ta C3 spacer 3' respectivamente. Dentre os bloqueadores que podem ser acoplados a extremidade 3' dos iniciadores, optamos pelo espaçador C3 por ser de boa eficiência, por ser de uso comercial e devido seu relativo baixo custo (Dames e col., 2007).

6 Determinação do Subtipo da Hemaglutinina

6.1 Reações de PCR para a amplificação de HA inteira

Foram realizados diversos testes para a amplificação do gene codificante de HA completo. Nestes testes utilizamos os primers BM-HA-1 (TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG) e BM-NS-890R (ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT) (Hoffman e cols., 2001). Para estes testes utilizamos 3 µL ou 4 µL de cDNA para volumes finais de 25 µL ou 50 µL. Também variamos a concentração dos iniciadores de 10 a 25 pMoles. As concentrações de cloreto de magnésio também foram objeto de testes e suas concentrações variaram de 1 a 3 mM. E por último, dentro dos vários testes realizados, variamos a concentração de DNTP entre 10 e 20 mM. O programa de ciclagem também foi modificado na tentativa de obtenção de produto amplificado da região HA inteiro. A quantidade de ciclos variou entre 35 e 45 vezes. A temperatura de anelamento variou de 55 a 68 °C com tempos de 30 segundos ou 1 minuto. E a temperatura de extensão utilizada em alguns testes foi de 68 °C e outros de 72 °C com tempos de 2 a 4 minutos. Os testes foram submetidos às reações de ciclagem no termociclador GeneAMP PCR system 9700 (Applied Biosystems) e analisados em eletroforese horizontal em gel de agarose.

7 Resultados

7.1 Detecção viral através de PCR em tempo real

Foram realizadas reações de PCR em Tempo Real como descrito para as amostras 1649 a 1748 (Apêndice A). O total de 100 amostras foram testadas para o vírus da influenza tipo A e para o subtipo H5. Todas as amostras foram negativas (Figuras de 16 a 18).

Figura 16. Resultado da PCR em Tempo Real para o tipo A. Amostras de 1728 a 1748. Somente os controles positivos mostraram curva de amplificação. As demais amostras tiveram o mesmo perfil.

Figura 17. Resultado do PCR em Tempo Real para o subtipo H5. Amostras de 1728 a 1748. Somente os controles positivos mostraram curva de amplificação. As demais amostras tiveram o mesmo perfil.

Figura 18. Controle interno para cada uma das 48 reações (20 amostras testadas para o Tipo A e subtipo H5 mais controles positivos e negativos). As curvas de amplificação mostram que as reações tiveram êxito e, portanto não continham nenhum inibidor. As outras amostras tiveram o mesmo perfil.

7.2 Detecção viral através da técnica de GeneScan

Foram realizadas reações de PCR com iniciador marcado para a detecção viral por GeneScan, utilizando a metodologia descrita. As amostras testadas foram as de número de 779 a 875, de 1749 a 1856, de 2308 a 2450 e de 2510 a 2530 (Apêndice B). O total de amostras testadas pelo método de GeneScan foi de 368 amostras. Da totalidade das amostras testadas, 7 foram positivas e 5 amostras suspeitas de serem positivas pelo método de GeneScan, como mostra a figura 19. As amostras positivas foram as de número 1803, 1820, 2408, 2409, 2410, 2412, 2413 e as suspeitas de positividade são 842, 1755, 1835, 1850 e 2527. O restante das amostras testadas foi negativo pela técnica de GeneScan.

Figura 19. Perfil das amostras testadas pela técnica de GeneScan, amostras positivas mostram pico em azul na região de 192 pares de bases, o peso molecular é mostrado com picos em vermelho. A - amostra 1803. B - amostra 1820. C - amostra 2408. D – controle positivo, este perfil de dois picos evidenciam uma quantidade grande de produtos de PCR marcado. E – controle negativo.

7.3 Detecção viral por Duplex Nested-PCR e RT-PCR tradicional com visualização das bandas em gel de agarose

Foram realizadas reações de PCR para a detecção viral em gel de agarose, utilizando a metodologia descrita. As amostras testadas foram as de número de 2531 a 2679 e as amostras 2579 e 2581 (numeração repetida) (Apêndice C). Nenhuma amostra foi positiva. Outras 52 amostras foram testadas através da técnica de Duplex Nested-PCR nos Estados Unidos da América, no Laboratório do Dr. Robert G. Webster. As amostras testadas nos EUA foram as de número 971 a 975, 1031 a 1039, 2393 a 2407, 2482 a 2491, 2511 a 2514 e 2519 a 2527 (Apêndice C). Destas amostras testadas, obtivemos 6 positivas, são elas, as amostras 974, 975, 1039, 2395, 2484 e 2486, infelizmente não dispomos das fotos. O total de amostras testadas foi de 203 amostras.

As amostras 2393 a 2467, 2511 a 2514 e 2519 a 2527 foram testadas também no Brasil e obtivemos resultados positivos para a amostra 2527 com a técnica de GeneScan, mas um resultado negativo com a técnica de PCR e visualização em gel de agarose. A amostra 2395 foi positiva no Laboratório do Dr. Webster, mas negativa no Laboratório do Dr. Edison Luiz Durigon.

No total foram obtidas 18 amostras positivas (Tabela 2). A amostra positiva 842 foi coletada de um pato (*Cairina moschata*), no Estado do Pará, as amostras 974 e 975 foram coletadas também de patos e de uma mesma residência, dentro de um universo de 5 patos apenas. A amostra positiva 1039 foi coletada de um peru (*Meliagres gallopavo*), no distrito de Marabitanas, município de São Caetano de Odivelas. As amostras 1755 e 1803 foram obtida de patos de uma granja comercial no Pará. As amostras de número 1820 e 1835 foram coletadas de uma mesma propriedade, a 1820 foi obtida de um pato e a 1835 de uma galinha caipira (*Gallus gallus*). A amostra de número 1850 foi obtida de outra galinha que ficava em contato com outras aves em um ambiente aberto. A amostra 2395 foi obtida de um trinta-réis-boreal (*Sterna hirundo*) que é migratório. As amostras 2408, 2409, 2410, 2412 e 2413 foram coletadas de pingüins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) que habitavam o aquário de Santos. As amostras 2484 e 2486 também foram obtidas de pingüins-de-Magalhães que estava no aquário do Guarujá. E por fim, a amostra 2527 foi obtida de um pato.

O total de amostras testadas neste trabalho é de 671 amostras. Sendo 203 por visualização de banda em gel de agarose, 368 testadas por geneScan e 100 testadas por Real Time.

Tabela 2. Amostras positivas.

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Método	Local	Data
842	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	GeneScan	Granja - PA	23/07/2005
974	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	PCR	D. Cleoníce - PA	25/07/2005
975	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	PCR	D. Cleoníce - PA	25/07/2005
1039	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	PCR	Isaura - Marab. - PA	25/07/2005
1755	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	GeneScan	Granja Beto - Terra Alta - PA	13/07/2006
1803	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	GeneScan	Granja Beto - Terra Alta - PA	13/07/2006
1820	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	GeneScan	S. Pará - S. Caet. Odivelas - PA	14/07/2006
1835	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	GeneScan	S. Pará - S. Caet. Odivelas - PA	14/07/2006
1850	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	GeneScan	Rubem Barbalho- PA	14/07/2006
2395	Trinta-reis-boreal	<i>Sterna hirundo</i>	PCR	Ilha da Canela - PA	02/11/2006
2408	Pingüim-de-Magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	GeneScan	Aquário de Santos	16/10/2006
2409	Pingüim-de-Magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	GeneScan	Aquário de Santos	16/10/2006
2410	Pingüim-de-Magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	GeneScan	Aquário de Santos	16/10/2006
2412	Pingüim-de-Magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	GeneScan	Aquário de Santos	16/10/2006
2413	Pingüim-de-Magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	GeneScan	Aquário de Santos	16/10/2006
2484	Pingüim-de-Magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	PCR	Aquário do Guarujá	23/10/2006
2486	Pingüim-de-Magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	PCR	Aquário do Guarujá	23/10/2006
2527	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	GeneScan	Praia Ajuruteua - PA	03/11/2006

7.4 Alinhamento das seqüências de nucleotídeos

Para comparação das seqüências das amostras 2408, 2409, 2410, 2412 e 2413 foi feito um alinhamento das seqüências de nucleotídeo e de aminoácidos (Fig. 20)

Figura 20 - Comparação entre as seqüências parciais de nucleotídeos e peptídicas de NS1. Pontos (.) indicam similaridade entre as seqüências obtidas, somente os nucleotídeos diferentes da seqüência da amostra 2408 estão representados. A ordem das seqüências foi determinada pela similaridade entre as seqüências e arranjadas pelo programa de computador "ClustalX" (versão 1.83) (Thompson et al., 1997).

De acordo com a figura apresentada (Fig. 20), na posição 32, onde todas as demais seqüências apresentam uma timina à seqüência da amostra 2410 apresenta uma guanina. Esta mutação é não silenciosa e resulta na mudança do aminoácido apolar valina para o aminoácido polar neutro glicina. Na posição 101 da figura, a seqüência 2408 apresenta uma adenosina, a 2412 uma citosina enquanto as outras possuem nesta posição, uma guanina. Estas mutações são silenciosas.

7.5 Pesquisa das seqüências de nucleotídeos no "Genbank"

Nós utilizamos a técnica de seqüenciamento para validar a técnica de GeneScan, porém as aproveitamos para fazer algumas análises. As seqüências de nucleotídeos obtidas das amostras coletadas foram submetidas a uma pesquisa no "Genbank" com o objetivo de verificar quais são as seqüências de nucleotídeos depositadas no banco, mais similares as seqüências que obtivemos. As seqüências obtidas, foram do gene NS1 e possuem um tamanho de 192 pares de bases.

A seqüência da amostra 2408, quando comparada com as seqüências do "Genbank", mostra similaridade de 100% com a seqüência A/Malaya/16/58(H2N2) (número de acesso AY210156) e 99,5% com as seqüências A/Memphis/49/1983(H1N1) (número de acesso CY019759), A/Baylor/11515/82(H1N1) (número de acesso CY010368) e A/Baylor/11735/82(H1N1) (número de acesso CY009624).

As seqüências das amostras 2409 e 2413 tiveram 100% de similaridade com as seqüências do "Genbank" A/Siena/9/1989(H1N1) (número de acesso CY036947), A/Siena/10/1989(H1N1) (número de acesso CY036827), A/Texas/36/1991(H1N1) (número de acesso CY033602) e (A/Beijing/262/1995(H1N1) (número de acesso CY033618) dentre outras. As seqüências das amostras 2410 e 2412 apresentaram similaridade com as mesmas seqüências do "Genbank" que as duas anteriores, porém com similaridade de 99%.

8 Aperfeiçoamento das Técnicas de Transcrição Reversa e PCR

Durante o período que permaneci no Laboratório do Dr. Robert G. Webster que pertence a Divisão de Virologia do Saint Jude Children's Research Hospital foram realizados testes para desenvolver as técnicas moleculares que utilizamos no estudo de amostras clínicas coletadas de aves em várias regiões do Brasil.

8.1 PCR a partir de cDNA sintetizado com um, dois ou iniciadores randômicos

A comparação feita utilizando-se cDNA sintetizando a partir de iniciadores randômicos, do iniciador Uni-12 e dos iniciadores Uni-12 e Uni-13 em conjunto se mostraram equivalentes e nenhum dos métodos de transcrição reversa citada se sobressaiu, mesmo utilizando diluições do cDNA em até 1000x para as reações de PCR (Fig.21).

8.2 Aperfeiçoamento da reação de PCR. Oxalato de amônia tetrametilada

A utilização de oxalato de amônia tetrametilada no PCR se mostrou bastante eficiente e será utilizado em todas as nossas reações de PCR (Fig. 22).

8.3 Reação de PCR otimizada para a obtenção de apenas um produto

A utilização de iniciadores desenvolvidos para bloquear a amplificação do gene codificador do gene NS não se mostrou totalmente efetivo, mas os testes preliminares foram promissores em determinadas condições. Outros testes estão sendo feitos para aperfeiçoar a reação. Um dos motivos para o insucesso do bloqueio da amplificação de NS, possivelmente ocorreu devido o tamanho do produto de NS ser quase 1.000 bases menor que o produto de HA. Produtos menores têm uma taxa de produção mais eficiente e em uma reação de PCR. Soma-se a isso, a competição por recursos existentes na mistura utilizada para as reações de PCR o que prejudica a amplificação de HA (Fig. 23).

Figura 21. Produtos de PCR feitos com cDNA sintetizado com iniciadores randômicos ou com os iniciadores Uni-12 e Uni-13 em conjunto. Colunas de 1 a 4, diluições do cDNA utilizado no PCR: sem diluição, 1:10, 1:100 e 1:1000. Colunas de 5 a 8, diluições do cDNA utilizado no PCR: sem diluição, 1:10, 1:100 e 1:1000. Coluna 9, amostra 35 e coluna 10, controle negativo e PM, peso molecular.

Figura 22. Produtos de PCR sem e com adição de oxalato de amônia tetrametilada (OAT) (concentração final de 2 mM). Colunas de 1 a 4, produtos sem adição de OAT, diluições do cDNA utilizado no PCR: sem diluição, 1:10, 1:100 e 1:1000. Colunas de 5 a 8, produtos com adição de OAT, diluições do cDNA utilizado no PCR: sem diluição, 1:10, 1:100 e 1:1000. Coluna 9, controle negativo e peso molecular (PM).

Figura 23. Produtos de PCR. Colunas 1 e 2, produtos (H5N3) com adição de iniciadores bloqueadores de NS, diluições do cDNA utilizado no PCR: sem diluição e 1:1000. Colunas 3 e 4, produtos (H7N1) com adição de iniciadores bloqueadores de NS, diluições do cDNA utilizado no PCR: sem diluição e 1:1000. Coluna 5, amostra 35. Colunas 6 e 7, produtos (H5N3) com adição de iniciadores bloqueadores e de OAT, diluições do cDNA utilizado no PCR: 1:100 e 1:1000. Colunas 8 e 9, produtos (H7N1) com adição de iniciadores bloqueadores e de OAT, diluições do cDNA utilizado no PCR: 1:100 e 1:1000. Coluna 10, amostra 35. Colunas 11 e 12, produtos (H5N3) somente com adição de OAT, diluições do cDNA utilizado no PCR: 1:100 e 1:1000. Colunas 13 e 14, produtos (H7N1) somente com adição de OAT, diluições do cDNA utilizado no PCR: 1:100 e 1:1000. Coluna 15, amostra 35. PM, peso molecular, primeira banda de 2.000 pares de bases (pb), a segunda com 1200 pb.

9 Discussão

A metodologia empregada neste trabalho seguiu uma estratégia que permitiu a coleta de um grande número de amostras clínicas de aves em quatro regiões do Brasil e continente Antártico. Na região Norte as amostras foram coletadas nos Estados do Pará e Rondônia, na região Nordeste, foram coletadas amostras no Maranhão e Pernambuco, na região Sudeste, foram feitas coletas no estado de São Paulo e na região Sul, as coletas se realizaram em Santa Catarina.

Os critérios de escolha das localidades de coleta de amostras levaram em conta as rotas de migração aviária.

Pelo Brasil passam duas rotas migratórias vindas da América do Norte, a rota atlântica, que segue a costa brasileira e a rota do Mississippi que passa pelo centro do Brasil (Stotz et al., 1992). Grande parte das espécies que chegam ao Brasil, vindas do hemisfério Norte, pousa na região Norte e Nordeste do Brasil para se alimentar e descansar, antes de prosseguir a migração pelo país ou a migração de retorno as suas localidade de origem.

No Norte do Brasil, nossas coletas foram realizadas região de Belém e na Ilha do Marajó no estado do Pará. A escolha desta região se deu não somente devido às rotas migratórias, mas também pelo aspecto cultural da população paraense. Nas festividades que ocorrem na semana do dia 12 de outubro, chamadas de Sírío de Nazaré, existe o hábito do consumo de pratos típicos a base de carne de pato. Devido a isso, existem na região inúmeros criadores de patos comerciais e, virtualmente, todas as casas da região possuem em seu quintal criações amadoras de patos domésticos. Além da criação de patos domésticos, é comum, em áreas rurais, a captura de patos selvagens que são vendidos e consumidos na época do Sírío de Nazaré.

Dentro das regiões de invernada, também estão localidades do Nordeste brasileiro, notadamente, na Coroa do Avião em Pernambuco e no pantanal maranhense que se localiza ao norte do Estado. A Coroa do Avião, pertencente ao município de Igarassu que faz parte da região metropolitana do Recife, é uma Ilhota com cerca de 25 mil metros quadrados, que é visitada por 18 espécies de aves que pertencem às famílias de Charadriidae, Scolopacidae e Laridae, devido à riqueza e disponibilidade de invertebrados marinhos que são consumidos quando a maré baixa (Telino-júnior et al., 2003). Como na Coroa do Avião, o pantanal maranhense também foi escolhido para a coleta devido à abundância de aves de diversas espécies de aves. O pantanal

maranhense é uma extensa área que fica alagada durante as chuvas que ocorrem nos seis primeiros meses do ano e atrai uma imensidão de aves em busca de alimentação que é farta na região (Fig. 12B a 12E). Foram coletadas, no Maranhão, cinco espécies de anatídeos.

Em Santa Catarina, foram coletadas amostras nas cidades de Araranguá, Navegantes, Tijucas e Barra Velha. A coleta em Santa Catarina foi motivada pela rota migratória do Mississipi que cruza o interior do país.

As amostras do Estado de São Paulo, que este trabalho contempla, são em sua maioria de pingüins coletados nos aquários dos municípios do Guarujá e Santos. Estas aves chegam ao Brasil esporadicamente, em sua maioria oriundas da Argentina, carregadas pela corrente das Malvinas e em geral chegam magras e doentes devido à exaustão ou pela contaminação com óleo (Ederli et al., 2009).

Em nossas coletas priorizamos as aves da ordem dos Anseriformes que constitui o principal grupo portador dos vírus da gripe do tipo A. Dentro deste grupo, o *Cairina moschata* (pato doméstico) foi o mais representativo com coletas feitas em 896 aves. Outras cinco espécies de Anseriformes foram alvo de coletas, são elas *Dendrocygna viduata* com 18 aves capturadas, *Netta erythrophthalma* com duas aves capturadas, *Dendrocygna autumnalis* com 44 aves capturadas, *Amazonetta brasiliensis* com quatro aves capturadas e *Anas bahamensis* com três aves capturadas, ainda, foram capturados para amostragem outros 14 anseriformes não identificados. Nenhuma dessas espécies é migratória com origem setentrional, embora façam migrações locais pelo país. Os anseriformes em geral são aves que formam bandos principalmente nos locais de forrageamento e, assim, os anatídeos do Brasil podem se misturar com anatídeos de origem setentrional como a marreca-de-asa-azul (*Anas discors*) (Sick, 2001). As espécies pertencentes à ordem dos Charadriiformes também podem ser portadoras do vírus da influenza. Esta ordem é representada pelos maçaricos, gaivotas, trinta-réis, talha-mar entre outros. Nós coletamos amostras de 11 espécies que são divididas em 5 famílias da ordem dos Charadriiformes. Setes destas espécies de Charadriiformes são migratórias: maçarico-de-papo-vermelho (*Calidris canutus*), que é um visitante do ártico assim como o maçarico-rasteirinho (*calidris pusilla*), o maçariquinho (*Calidris minutilla*), o maçarico-pintado (*Actitis macularia*), o maçarico-grande-de-perna-amarela (*Tringa melanoleuca*). O trinta-réis-boreal (*Sterna hirundo*) é uma espécie que visita o Brasil regularmente, vindo principalmente da costa Leste americana, entre a Virgínia e Massachusetts, incluindo Nova Iorque. Existem registros, também, de aves oriunda dos

Açores que fica entre a costa Norte da África e América do Norte e Ilhas Canárias, localizadas próximas o litoral do Marrocos (Lima et al., 2005). A batuíra-de-bando (*Charadrius semipalmatus*) é outro visitante do hemisfério Norte, vindo principalmente dos Estados Unidos e Canadá. Estas aves litorâneas podem introduzir nas espécies nativas vírus da influenza do tipo A, visto que já foram assinaladas como portadoras dos subtipos de hemaglutinina de H1 a H13 e em relação à neuraminidase foram encontradas nestas espécies todos os nove subtipos em diversos arranjos com os subtipos de hemaglutinina citados (Krauss et al., 2004). Outro fator agravante é que estas aves ao seguir suas rotas migratórias, a rota do atlântico e a rota do Mississipi, se cruzam com outras três rotas distintas, todas na região do ártico, a rota do pacífico que cruza todo o litoral do pacífico do continente, a rota do atlântico leste que passa por parte da Europa, África e Ásia, se unido as demais rotas na região do ártico do continente americano e, por fim, a rota do leste asiático/australiano que se cruza com a rota do Mississipi também nas altas latitudes da América, mais especificamente na região do Alaska. O cruzamento das rotas migratórias de diversas espécies facilita a dispersão de vírus da influenza de origens variadas pelo continente americano.

As aves silvestres regionais ou migratórias entram em contato com as aves residentes e aves de fundo de quintal, o que possibilita a transmissão, caso sejam portadoras, do vírus da gripe (Fig. 10C). Os patos domésticos pertencem à mesma espécie do pato selvagem (*Cairina moschata*) e é comum o cruzamento dos patos selvagens com os domesticados (Fig. 10A a 10C), mesmo a caça e a captura de espécimes na natureza são comuns em áreas próximas a rios. Estas práticas favorecem a introdução do vírus da influenza e outros agentes infecciosos em granjas e em criações de fundo de quintal.

Outra prática comum no Brasil é a criação de aves em conjunto com porcos, aves de estimação, galináceos, eqüinos, cachorros e gatos (Fig. 10B). Os anseriformes são os portadores principais dos vírus da gripe, os suínos domésticos, além de poderem servir de ponte entre diferentes subtipos de gripe (H1N1, H1N2, H3N2 e H3N1), os frangos são aves extremamente suscetíveis a gripe e morrem rapidamente quando se infectam com influenza de alta patogenicidade, os cavalos são suscetíveis vírus dos subtipos H3N8 e H7N7 (Daly et al., 2004), os cães também possuem um subtipo viral adaptado a ele, este subtipo é um H3N8 derivado do vírus eqüino (Dubovi e Njaa, 2008) e os gatos são suscetíveis ao vírus H5N1. Este ambiente de convivência entre vários

animais domésticos e em contato com animais silvestres favorece o surgimento de vírus recombinantes com potencial infeccioso para animais ou seres humanos.

Existem 144 subtipos possíveis do vírus da gripe A, mas somente os subtipos que carregam o H5 e o H7, até o momento, causaram influenza aviária de alta patogenicidade. Portanto, apesar de não ter sido registrado casos confirmados de infecção com vírus de alta patogenicidade no Brasil, podem circular na região, dentro das criações domésticas de pato e outras aves, vírus da gripe de baixa patogenicidade.

Ao todo foram coletadas 48 espécies entre passeriformes, marrecos selvagens, aves costeiras, pinguins e aves de fundo de quintal.

Neste trabalho foram analisados amostras de 41 espécies de aves.

Este trabalho é pioneiro ao abranger regiões distintas do Brasil e a coleta de grande número de amostras e, portanto, desenvolvemos em nosso laboratório todos os procedimentos e padronizações necessárias para que os objetivos fossem cumpridos.

Em nosso trabalho de campo, coletamos, através de zaragatoas, amostras de traquéia e de cloaca. O vírus da gripe se replica, nas aves, nos tecidos traqueais e intestinais, podendo ser dispersos no ambiente por estas vias. A traquéia é um ambiente menos contaminado com microorganismos podendo ser utilizado para o isolamento e a extração de RNA. No entanto, as amostras cloacais possuem maior carga viral e em aves portadoras é no tecido gástrico que o vírus da gripe se replica, e através das fezes é eliminado. Foram coletadas também amostras de sangue de todas as aves capturadas. O objetivo desta coleta foi investigar se a ave entrou em contato com o vírus da gripe e com quais subtipos virais foi este contato. Para isso é utilizado a técnica de inibição da hemaglutinação com a utilização de padrões virais inativados.

Para determinar a melhor metodologia de detecção viral, foram empregadas quatro técnicas distintas. A técnica de Real Time PCR, a técnica de GeneScan, a técnica de RT-PCR tradicional e a técnica de Duplex Nested-PCR com a utilização de gel de agarose para a visualização das bandas. A técnica de Real Time PCR é promissora, no entanto, nenhuma das amostras utilizadas foi positiva para a técnica. Esta técnica ainda é cara e mais estudos de padronização são necessários para que seja empregada com alto índice de sucesso em amostras clínicas. Melhores resultados poderiam ser obtidos através da utilização de material genético vindo de amostras cultivadas. Resultados semelhantes foram encontrados com a utilização da técnica de RT-PCR com a detecção de bandas em gel de agarose. No total, nós analisamos 671 amostras.

Os melhores resultados foram os encontrados pela técnica de GeneScan. Por este método detectamos 7 amostras positivas e 5 amostras suspeitas, apesar destas últimas estarem com o tamanho de 192 pares de bases, o esperado para o teste, o pico que produziram foi pequeno, ficando próximo ou abaixo de 150 unidades de fluorescência relativa (RFU em inglês), para que os resultados sejam confiáveis, segundo instruções do fabricante (Applied Biosystems), os picos devem estar entre 150 e 4000 RFU. Ainda que cinco amostras (842, 1755, 1835, 1850 e 2527) tenham ficado próximo ou abaixo dos 150 RFU, podemos inferir, que estas amostras sejam positivas devido à qualidade de nossas reações, picos de fundo originários de restos de material fluorescente originados por baixa qualidade de purificação foram praticamente inexistentes em nossas reações, os picos indesejáveis ficaram abaixo dos 50 RFU. As demais amostras positivas para a técnica de GeneScan foram as de número 1803, 1820, 2408, 2409, 2410, 2412 e 2413. Para validar a técnica de GeneScan, determinamos a sequência de nucleotídeos de 5 amostras positivas. As sequências obtidas não são suficientes para determinar o subtipo, o gene codificador da NS1 é muito estável entre todos os subtipos do tipo A, além do tamanho reduzido do produto de PCR que é de 192 pares de bases, as cinco amostras que foram sequenciadas são de amostras coletadas de pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) do aquário de Santos.

Foram obtidas ainda 6 amostras positivas no laboratório do Dr. Webster. As amostras positivas são as de número 974, 975, 1039, 2395, 2484 e 2486.

Das 18 amostras positivas, 7 foram coletadas de patos (*Cairina moschata*), 7 foram obtidas de pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), 2 de galinhas (*Gallus gallus*), 1 de peru (*Meliagres gallopavo*) e 1 de trinta-réis-boreal (*Sterna hirundo*).

Três das amostras (842, 1755 e 1803) foram obtidas de patos em granjas comerciais, duas em uma única granja. Na granja que se localiza no município do norte paraense de Vigia de Nazaré encontramos uma amostra positiva (842) de um total de 55 patos amostrados. Em uma granja localizada em Terra Alta, outro município do Pará, encontramos duas amostras positivas (1755 e 1803) de um total de 60 patos. Esta granja é aberta e as aves criadas entram em contato com aves silvestres (Fig. 10C).

As amostras positivas 974 e 975 foram coletadas de patos de fundo de quintal no município de Vigia de Nazaré. O total de patos nesta casa era de apenas 5 indivíduos. Ou seja, um alto índice de infecção pelo vírus da gripe. Este cenário é preocupante no caso do surgimento de vírus da gripe de alta patogenicidade, que pode trazer prejuízos

econômicos a região ou mesmo problemas de saúde. Outra casa que teve dois casos confirmados de gripe é localizada em São Caetano de Odivelas no Pará, as amostras positivas são a 1820 e a 1835, o total de aves amostradas nesta residência foi de 19 indivíduos. O chefe desta família é pescador, em seu trajeto de pesca monta armadilhas para a captura de anatídeos nas beiras dos rios e no mangue; as aves capturadas depois que engordam não vão mais embora, enquanto não ficam mansos e gordos estes anatídeos ficam com uma corda fina amarada em um dos pés e a uma estaca presa ao solo. As aves depois da engorda são comercializadas vivas e em geral, depois de compradas não são consumidas de imediato, ao contrário, são introduzidas em meio a outras aves domésticas, o que facilita a dispersão viral.

A amostra 1850 foi coletada de uma galinha em uma residência do município de São Caetano de Odivelas no Pará. Esta propriedade criava em conjunto tanto anatídeos como galináceos, não detectamos vírus da gripe nos anatídeos, provavelmente devido à eliminação de baixa carga viral destes espécimes portadores, a galinha, apesar de aparentemente não estar sintomática, não é portadora, e, portanto a carga viral eliminada é maior, o que facilita a detecção. Quando um Galliforme se infecta com vírus da gripe de baixa patogenicidade, após um período de alguns dias se curam e a carga viral desaparece. Um vírus influenza de alta patogenicidade mata aves da ordem dos Galliformes e pode acabar com um plantel inteiro em questão de horas.

Outra amostra de pato (2527) foi obtida em uma residência localizada na praia de Ajuruteua no município de Bragança – PA. Nesta mesma praia foram coletadas amostras de maçaricos migratórios que podem ter infectado a ave em questão. Na mesma localidade, na Ilha de Canela, que também pertence ao município de Bragança, foi obtida uma amostra positiva (2395) de um trinta-reis-boreal (*Sterna hirundo*) que é migratório e portador de vírus da gripe. Estas aves têm o potencial de infectar através das fezes criações comerciais com pouca infra-estrutura ou mesmo criações de fundo de quintal.

A amostra positiva 1039 foi coletada de um peru (*Meleagris gallopavo*) no distrito de Marabitanas que pertence ao município paraense de São Caetano de Odivelas, esta ave fazia parte de um pequeno plantel de 9 perus que eram criados próximos a patos domésticos com acesso a um rio que existe a poucos metros da residência onde estas aves eram criadas. Os patos domésticos entram em contato com aves silvestres ao freqüentarem o rio, isto possibilita que vírus da gripe infectem estes patos e, por conseguinte, infectem outras aves do distrito.

As amostras positivas 2408, 2409, 2410, 2412 e 2413 foram coletadas de pingüins do aquário de Santos e as amostras 2484 e 2486 foram obtidas de pingüins do aquário do Guarujá. Estas aves não são nativas do Brasil e acabam chegando ao litoral por se perderem de seus grupos e chegam ao nosso litoral levadas pela corrente marítima das Malvinas. Estas aves normalmente chegam debilitadas e doentes. Os pingüins-de-Magalhães habitam a patagônia da Argentina e do Chile. O alto índice de infecção por vírus da influenza pode estar relacionada à influenza humana onde os pingüins se infectam através de seus tratadores, ou, se infectam através de novos pingüins que são resgatados das praias. Não se tem informação se o pingüim-de-Magalhães é portador do vírus da gripe ou apenas se infecta com a influenza. Seja qual o for motivo da infecção destes pingüins pela gripe é consistente nos dois aquários, no de Santos e no do Guarujá.

A quantidade de 18 amostras positivas, do total de 671 amostras testadas, perfazendo quase 2,7% de positividade não pode ser considerado um número baixo, ainda mais se tratando de um trabalho pioneiro como este. Um trabalho de monitoramento semelhante ao nosso foi feito na Argentina, seus resultados mostram que o percentual de amostras positivas é de apenas 0,41%, do total de 2895 amostras testadas, conseguiram através de métodos moleculares apenas 12 amostras positivas, do total destas, apenas uma foi isolada com sucesso em cultura de ovos embrionados (Pereda et al., 2008). Apesar da existência de influenza em aves no Brasil e Argentina, estes resultados indicam que a prevalência é baixa. Novos testes deverão ser realizados no intuito de aperfeiçoar as técnicas de coleta e de laboratório para melhorar estes índices.

Um lote de 88 amostras foram testadas em duplicatas, uma das duplicatas em nosso laboratório e outra no laboratório do Dr. Webster, 87 destas amostras foram negativas para ambos os laboratórios. No entanto, nós obtivemos como positiva a amostra 2527, no laboratório dos EUA essa amostra foi negativa, porém, eles obtiveram como positiva a amostra 2395 e nós não obtivemos sucesso na detecção viral para esta amostra. Estas diferenças ocorrem devido à utilização de materiais como kits de extração de RNA e de PCR distintos nos dois laboratórios ou devido à baixa concentração viral nestas amostras o que pode resultar em falsos negativos. Isto corrobora com a necessidade de se fazer novos testes para que a recuperação viral destas amostras seja maior.

Para a determinação do subtipo viral, através de métodos moleculares, é necessário que se obtenha a sequência do gene codificador da hemaglutinina e da neuraminidase. Não obtivemos sucesso em nossas tentativas de determinar a sequência do segmento genômico 4 inteiro. A obtenção da sequência inteira do gene que codifica a hemaglutinina foi o método de escolha, como todos os segmentos gênicos da influenza possuem uma região conservada na região 5' e 3', a utilização dessas regiões para a amplificação do gene da hemaglutinina é viável. A alternativa a este método é a realização de 16 reações separadas para cada amostra positiva. Uma reação para cada subtipo de hemaglutinina. As causas para os insucessos foram, provavelmente, quantidade insuficiente de material genético obtido das amostras clínicas e/ou mutações na região que se parecia com a porção 3' do iniciador, ainda que a região seja conservada, mutações podem ocorrer, a técnica funciona bem para amostras onde os vírus foram cultivados.

Para melhorar a detecção viral das amostras clínicas e favorecer a amplificação do gene codificador da hemaglutinina fizemos alguns aperfeiçoamentos e escolhemos materiais que podem melhorar nossas técnicas moleculares.

A escolha do kit de extração como primeiro passo, deve ser feita com atenção, o melhor kit que testei foi o “High Pure Viral RNA Extraction Kit” da Roche inc. Este kit consegue eliminar os inibidores, comuns em amostras de campo, das reações de transcrição reversa e PCR.

Para a reação de transcrição reversa utilizamos dois iniciadores específicos para as regiões conservadas, 12 nucleotídeos em 5' e 13 na região 3' do gene. Como a transcriptase reversa possui também a atividade de polimerase, o esperado é que o produto gerado fosse “cDNA dupla fita”. A reação de transcrição reversa também foi feita com a utilização apenas do iniciador Uni 12, para efeito de comparação. Depois de feito o PCR, o resultado com a utilização de cDNA sintetizado em ambos os métodos de transcrição reversa foi semelhante, não tendo vantagem, neste teste, da utilização de dois primers na reação de transcrição reversa.

Outro teste que realizamos para melhorar a especificidade e quantidade do produto de PCR foi a adição de oxalato de amônia tetrametilada nas reações em cadeia da polimerase. A utilização do aditivo proporcionou um aumento significativo na quantidade de produto do gene codificador da hemaglutinina, sem aumento expressivo do produto do gene codificador da proteína não estrutural (NS). Devido à similaridade existente entre as sequências 5' e 3' dos genes da hemaglutinina e da NS, que são alvos

dos iniciadores, os dois genes são amplificados conjuntamente, sendo necessário que seja feita uma purificação em gel de agarose para a obtenção apenas do produto da hemaglutinina (Fig. 21). O aumento na quantidade de produto de PCR do gene da hemaglutinina, sem aumento do NS, facilita a purificação em gel de agarose do produto desejado. É esperado que a adição de oxalato de amônia tetrametilada auxilie na obtenção de produto do gene codificador da hemaglutinina proveniente de vírus de amostras clínicas. Além da utilização do oxalato de amônia tetrametilada, utilizamos uma abordagem para inibir a produção de amplificado do gene de NS, que por ser menor, tem uma taxa de produção mais eficiente nas reações de PCR e se torna um competidor pelos recursos da mistura utilizada na reação de PCR. Apesar da adição de oxalato de amônia tetrametilada melhorar a quantidade de produto de PCR do gene da hemaglutinina, a eliminação do produto de NS eliminaria a etapa de purificação em gel de agarose, que apesar de ser eficiente gera perda de na quantidade de amplificado. Como a carga viral de amostras clínicas é baixa, em relação aos cultivados, qualquer alteração no protocolo que evite perda na quantidade de produto pode ser o diferencial entre o sucesso ou o fracasso na utilização deste produto para a subtipagem viral através de técnicas de determinação de sequência. Para inibir a produção de amplificados do gene da NS, utilizamos um par de iniciador com um espaçador do tipo C3, na região 3' do iniciador, para bloquear a síntese de produto de NS. Para tanto, utilizamos os iniciadores sem o espaçador (BM-HA-1 e BM-NS-890R) e outros dois iniciadores que foram alongados em 6 nucleotídeos para o BM-HA-1 e de 3 nucleotídeos para o BM-NS-890R. Os nucleotídeos adicionais são específicos apenas para o gene codificador de NS, e como são maiores, é esperado que se combinem com o cDNA antes dos iniciadores sem os nucleotídeos adicionais. Os iniciadores maiores possuem em sua extremidade 3' espaçadores do tipo C3 e são denominados de BM-HA-1-C3 e BM-NS-890R-C3. Os resultados iniciais não foram promissores, no entanto, algumas modificações poderão ser feitas para a obtenção do efeito desejado. Entre elas, a troca do espaçador C3 por dideoxinucleotídeos e mais testes para determinar a concentração ótima de cada iniciador.

10 Conclusão

Com base nos resultados obtidos podemos concluir:

1 – Que a metodologia de coleta e de análise empregada foi adequada visto à porcentagem de positivos detectados. Em particular a técnica de GeneScan se mostrou, de todos os testes realizados, a melhor em relação aos resultados positivos. Esta técnica além de ser de fácil utilização não possui custo proibitivo e foi validada por determinação da sequência de produtos positivos. A alternativa, vista neste trabalho, é a utilização da técnica de Duplex Nested-PCR, que também foi bastante sensível e seu custo também não é proibitivo embora necessite de mais horas de trabalho humano para o processamento das amostras que a técnica de GeneScan.

2 – Que existe influenza aviária no Brasil, notadamente as de baixa patogenicidade. E que por isso, a vigilância epidemiológica deve ser feita de modo constante para detectar possíveis focos futuros, principalmente de vírus da influenza de alta patogenicidade.

3 – Que aves migratórias que visitam o Brasil, como o trinta-reis-boreal (*Sterna hirundo*), podem ser fontes de introdução viral em populações silvestres ou domésticas.

4 – Que o monitoramento deve ser continuado devido à possibilidade de introdução de vírus de alta patogenicidade via aves migratórias e a possibilidade de recombinação genética gerada pela convivência estreita de diversas espécies animais.

Referências Bibliográficas*

- Alexander, D. J. (2000). "A review of avian influenza in different bird species." *Vet. Microbiol.*, 74(1-2): 3-13.
- ABEF. (2008). "Relatório anual 2008/2009." Disponível em: <http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf>. Acesso em: 13 nov. 2009.
- Boere, G.C., Stroud, D. A. (2006). "The flyway concept: what is is and what it isn't." In: Boere GC, Galbraith CA, Stroud DA, editors. *Waterbirds around the world*. pp. 40-47. The Stationary Office, Edinburgh, UK. 2006. Disponível em: <http://www.jncc.gov.uk/PDF/pub07_waterbirds_part1_flywayconcept.pdf>. Acesso em: 10 setembro. 2009.
- Braakman, I., Anken, E. (2000). "Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum." *Traffic* 1: 533-539.
- Bridges, C. B., Kuehnert, M. J., Hall, C. B. (2003). "Transmission of influenza: implications for control in health care settings." *Clin Infect Dis.*, 37(8): 1094-1101.
- Brown, E. G. (2000). "Influenza virus genetics." *Biomed. Pharmacother.*, 54(4): 196-209.
- Büchen-Osmond, C. (2003). "Orthomyxoviridae". In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3. ICTVdB Management. Columbia University, New York, USA.
- Capua, I., Alexander, D. J. (2002). "Avian influenza and human health." *Acta Trop.*, 83(1): 1-6.
- Capua, I., Alexander, D. J. (2004). "Avian influenza: recent developments." *Avian Pathol.*, 4: 393-404.
- Chambers, T. M., Yamnikova, S., Kawaoka, Y., Lvov, D. K., Webster, R.G. (1989). "Antigenic and molecular characterization of subtype H13 hemagglutinin of influenza virus." *Virology*, 172(1): 180-188.
- Chen, Z., Krug, R. M. (2000). "Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells." *Trends Microbiol.*, 8(8): 376-383.
- Claas, E. C. J., Sprenger M. J. W., Kleter G. E. M., van Beek R., Quint W. G. V., Masurel N. (1992). "Type-specific identification of influenza viruses A, B and C by the polymerase chain reaction." *J. Virol. Methods*, 39: 1-13.
- Cox, N. J., Subbarao, K. (2000). "global epidemiology of influenza: past and present." *Annu. Rev. Med.*, 51: 407-421.

* De acordo com:

American Psychological Association (2001). *Publication Manual of the American Psychological Association* (5th ed.). Washington, DC: Author.

- Daly, J. M., Newton, J. R., Mumford, J. A. (2004). "Current perspectives on control of equine influenza." *Vet. Res.*, 35: 411–423.
- Dames, S., Margraf R. L., Pattison D. C., Wittwer C. T., Voelkerding K. V. (2007). "Characterization of Aberrant Melting Peaks in Unlabeled Probe Assays." *J. Mol. Diag.*, 9(3): 290-296.
- Dubovi, E. J., Njaa, B. L. (2008). "Canine Influenza." *Vet. Clin. N. Am.: Small Anim. Pract.*, 38(4): 827-835.
- Ederli, N. B., Oliveira, F. C. R., Monteiro C. M., Silveira L. S., Rodrigues M. L. A. (2009). "Ocorrência de *Contracaecum pelagicum* Johnston & Mawson, 1942 (Nematoda, Anisakidae), em pinguim-de-magalhães (*Spheniscus magellanicus* Forster, 1781) (Aves, Spheniscidae) no litoral do Espírito Santo." *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 61(4): 1006-1008.
- Edgar, R. C. (2004). "MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput" *Nucleic Acids Research*, 32(5): 1792-1797.
- Fouchier, R. A. M., Schneeberger, P. M., Rozendaal, F. W., Broekman, J. M., Kemink, S. A. G., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G. F., Schutten, M., Doornun, G. J. J., Koch G., Bosman, A., Koopmans, M., Osterhaus, A. D. M. E. (2004). "Avian influenza (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome." *P.N.A.S.*, 101(5): 1356-1361.
- Fouchier, R. A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B., Osterhaus, A. D. (2005). "Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls." *J. Virol.*, 79(5): 2814-2822.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hay, A. J. (1998). "The virus genome and its replication." p. 43-53. in K. G. Nicholson, R. G. Webster, and A. J. Hay (ed.), *Textbook of influenza*. Blackwell Science, London, England.
- Hilleman, M. R. (2002). "Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control." *Vaccine*, 20: 3068-3087.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., Perez, D. R. (2001). "Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses." *Archives Virol.*, 146(12): 2275-2289.
- Honda, A., Endo, A., Mizumoto, K., Ishihama, A. (2001). "Differential roles of viral RNA and cRNA in functional modulation of the influenza virus RNA polymerase." *J. Biol. Chem.*, 276(33): 31179-31185.
- Horimoto, T., Kawaoka, Y. (2001). "Pandemic threat posed by avian influenza A viruses." *Clin. Microbiol. Rev.*, 14(1): 129-149.
- Kaiser, J. (2006). "A one size fits all flu vaccine." *Science*, 312: 380-382.

- Katz, J. M. (2003). "The impact of avian influenza viruses on public health." *Avian Dis.*, 47(3): 914-920.
- Kovárová, M., Dráber, P. (2000). "New specificity and yield enhancer of polymerase chain reaction." *Nucleic Acid Res.*, 28(13): i-iv.
- Klumpp, K., Ruigrok, R. W., Baudin, F. (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *EMBO J.*, 16(6): 1248-1257.
- Koenig, M., Kosha, S., Hickman, M., Heath, D., Riddell, S., Aldous, W. (2003). "Detection of influenza virus from throat and pharyngeal swabs with a nested duplex light cycler RT-PCR." *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 46(1): 35-37.
- Krauss, S., Walker D., Pryor, P. S., Niles, L., Chenchong, L., Hinshaw, V. S., Webster, R. G. (2004). "Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America" *Vector-Born Zoon. Dis.*, 4(3): 177-189.
- Kuszewski, K., Brydak, L. (2000). "The epidemiology and history of influenza." *Biomed. Pharmacother.*, 54(4):188-195.
- Laver, G., Garman, E. (2002). "Pandemic influenza: its origin and control." *Microbes Infect.*, 4(13): 1309-1316.
- Lima, P. C., Hays, H., Lima R. C. F. R., Cormons T., Cormons G., DiCostanzo J., Santos, S. S. (2005) "Recuperações de *Sterna hirundo* (Linnaeus, 1758) na Bahia, Brasil, entre 1995 e 2004." *Revista Brasileira de Ornitologia*, 13(2): 177-179.
- Itzstein, M. (2007). "The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors." *Nat. Rev. Drug Discovery*, 6: 967-974.
- Mena, I., Jambriña, E., Albo, C., Perales, B., Ortín, J., Arrese, M., Vallejo, D., Portela, A. (1999). "Mutational analysis of influenza A virus nucleoprotein: identification of mutations that affect RNA replication." *J. Virol.*, 73(2): 1186-1194.
- Mould, J. A., Li, H. C., Dudlak, C. S., Lear, J. D., Pekosz, A., Lamb, R. A., Pinto, L. H. (2000). "Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza A virus." *J. Biol. Chem.*, 275(12): 8592-8599.
- MS. (2009). "Situação epidemiológica da Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 no Mundo e no Brasil, até semana epidemiológica 40 de 2009." Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_40_influenza_pandemica_19out2009_atual.pdf> Acesso em: 14 de Nov. 2009.
- Nakagawa, Y., Oda, K., Nakada, S. (1996). "The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome." *J. Virol.*, 70(9): 6390-6394.
- Nakajima, S., Nobusawa, E., Nakajima, K. (2000). "Variation in response among individuals to antigenic sites on the HA protein of human influenza virus may be

- responsible for the emergence of Drift strains in the human population.” *Virology*, 274: 220-231.
- Neumann, G., Watanabe, T., Kawaoka, Y. (2000). “Plasmid-driven formation of influenza virus-like particles.” *J. Virol.*, 74(1): 547-551.
- Nicholson, K. G. (1998). “Human influenza.” p. 219-264. *in* K. G. Nicholson, R. G. Webster, A. J. Hay (ed.), Textbook of influenza. Blackwell Science, London, England.
- OIE. (2009). “Outbreaks of Avian Influenza (subtype H5N1) in poultry. From the end of 2003 to 5 November 2009.” Disponível em: <http://www.oie.int/downld/AVIAN%20INFLUENZA/Graph%20HPAI/graphs%20HPAI%2005_11_2009.pdf>. Acesso em: 15 nov. 2009.
- Offringa, D. P., Tyson-Medlock, V., Ye, Z., Levandowski, R. A. (2000). “A comprehensive systematic approach to identification of influenza A virus genotype using RT-PCR and RFLP.” *J. Virol. Meth.*, 88: 15-24.
- O'Neill, R. E., Talon, J., Palese, P. (1998). “The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins.” *Embo J.*, 17(1): 288-296.
- Pereda, A. J., Uhart, M., Perez, A. A., Zaccagnini, M. E., Sala, L., Decarre, J., Goijman, A., Solari, L., Suarez, R., Craig, M. I. (2008). “Avian Influenza Virus Isolated in Wild Waterfowl in Argentina: Evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America.” *Virology*, 378(2): 363-370.
- Potter, C. W. (2001). “A histroy of infuenza” *J. Appl. Microbiol.*, 91(4): 572-579.
- Rajakumar, A., Swierkoszt, E. M., Schulze, I. T. (1990). “Sequence of an influenza virus hemagglutinin determined directly from a clinical sample.” *Proc. Natl. Acad. Science*, 87: 4154-4158.
- Sick, H. (2001). “Composição da avifauna brasileira”. *In* J. F. Pacheco (Ed.), *Ornitologia brasileira* (pp. 129-135). Rio de Janeiro, Brasil: Nova Fronteira.
- Skehel, J. J., Wiley, D. C. (2002). “Influenza haemagglutinin.” *Vaccine*, 20(2): 51-54.
- Soares, P. B., Demetrio, C., Sanfilippo, L., Kawanoto, A. H, Brentano, L., Durigon, E. L. (2005). “Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds.” *J. Virol. Methods*, 123(2): 125-130.
- Steininger, C., Kundi, M., Aberle, S. W., Aberle, J. H., Popow-Kraupp T. (2002). “Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups.” *J. Clin. Microbiol.*, 40(6): 2051-2056.
- Stotz, D. F., Bierregaard, R. O., Cohn-Haft, M., Petermann, P., Smith, J., Whittaker, A., Wilson, S., V. (1992). “The status of North American migrants in central Amazonian Brazil.” *The Condor*, 94: 608-621.

- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Janczewski, T. A., Fanning, T. G. (2001). "Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus." *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 356(1416): 1829-1839.
- Telino-Júnior, W. R., Azevedo-Júnior, S. M., Lyra-Neves, R. M. (2003). "Censo de aves migratórias (Charadriidae, Scolopacidae e Laridae) na Coroa do Avião, Igarassu, Pernambuco, Brasil." *Rev. Bras. de Zool.*, 20(3): 451-456.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G. (1997). "The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T., M., Kawaoka, Y. (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol. Rev.*, 56(1): 152-179.
- Webster, R. G., Shortridge, K. F., Kawaoka, Y. (1997). "Influenza: interspecies transmission and emergence of new pandemics." *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 18(4): 275-279.
- Webster, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J., Murti, K. G. (1978). "Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks." *Virology*, 84(2): 268-278.
- World Health Organization (WHO) (1999). Influenza Fact Sheet 211. Disponível em: <<http://nzdl.sadl.uleth.ca/cgi-bin/library?e=d-00000-00---off-0cdl--00-0---0-10-0---0---0direct-10---4-----0-11--11-en-50---20-help---00-0-1-00-0-0-11-1-0utfZz-8-00&a=d&c=cdl&cl=CL1.242&d=HASH7dea2e7362b7935d478d4a.2>>. Acesso em: 25 out. 2009.
- WHO. (2005). "Ten concerns if avian influenza becomes a pandemic." Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/influenza/pandemic10things/en/index.html>>. Acesso em: 01 nov. 2009.
- WHO. (2006). "Avian influenza ("bird flu")." Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en>. Acesso em: 30 out. 2009.
- WHO. (2009a). "H5N1 avian influenza: Timeline of major events." Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_timeline/en/index.html>. Acesso em: 28 out. 2009.
- WHO. (2009b). "Cumulative Number of Confirmed Human Cases of Avian Influenza A/(H5N1) Reported to WHO." Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2009_09_24/ee/index.html>. Acesso em: 29 out. 2009.
- WHO. (2009c). "Areas with confirmed cases of H5N1 avian influenza since 2003." Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_H5N1_inHumanCUMULATIVE_FIMS_20090924.png>. Acesso em: 02 nov. 2009

- WHO. (2009d). "Influenza A (H1N1): WHO announces pandemic alert phase 6, of moderate severity." Disponível em: <http://www.euro.who.int/mediacentre/PR/2009/20090611_1>. Acesso em: 02 nov. 2009.
- WHO. (2009e). "Pandemic (H1N1) 2009 - update 74." Disponível em: <http://www.who.int/csr/don/2009_11_13/en/index.html>. Acesso em: 14 nov. 2009.
- Yewdell, J., Garcia-Sastre, A. (2002). "Influenza virus still surprises." *Cur. Opin.Microbiol.*, 5: 414-418.
- Zambon, M. C. (1999). "Epidemiology and pathogenesis of influenza." *J. Antimicrob. Chemother.*, 44(B): 3-9.

Apêndices

Apêndice A – Tabela das amostras testadas pelo método de Real Time PCR.

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1649	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1650	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1651	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1652	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1653	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1654	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1655	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1656	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1657	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1658	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1659	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1660	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1661	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1662	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Granja-Galinha-Vigia-PA	Negativo
1663	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1664	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1665	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1666	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1667	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1668	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1669	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1670	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1671	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1672	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1673	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1674	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1675	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1676	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1677	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1678	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1679	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1680	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1681	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1682	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1683	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1684	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1685	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1686	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1687	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1688	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1689	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1690	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1691	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1692	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1693	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1694	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1695	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1696	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1697	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1698	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1699	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1700	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1701	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1702	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Sítio Açai-Vigia- PA	Negativo
1703	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberon-Vigia- PA	Negativo
1704	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberon-Vigia- PA	Negativo
1705	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberon-Vigia- PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1706	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1707	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1708	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1709	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1710	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1711	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1712	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1713	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1714	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1715	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1716	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1717	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1718	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	11/07/2006	Kleberson-Vigia- PA	Negativo
1719	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Pio XII-D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1720	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Pio XII-D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1721	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Pio XII-D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1722	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Pio XII-D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1723	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	Pio XII-D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1724	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	Pio XII-D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1725	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	Pio XII- D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1726	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	Pio XII- D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1727	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	Pio XII- D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1728	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	Pio XII- D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1729	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	Pio XII- D.Gertrudes - Vigia- PA	Negativo
1730	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1731	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1732	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1733	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1734	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1735	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1736	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1737	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1738	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	12/07/2006	PioXII- D.Adelina- Vigia PA	Negativo
1739	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1740	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1741	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1742	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1743	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1744	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1745	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1746	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1747	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo
1748	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	12/07/2006	Jaime-Terra Alta- PA	Negativo

Apêndice B – Tabela das amostras testadas pelo método de GeneScan.

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
779	Ave	-----	----	-----	Negativo
780	Ave	-----	----	-----	Negativo
781	Ave	-----	----	-----	Negativo
782	Ave	-----	----	-----	Negativo
783	Ave	-----	----	-----	Negativo
784	Ave	-----	----	-----	Negativo
785	Ave	-----	----	-----	Negativo
786	Ave	-----	----	-----	Negativo
787	Ave	-----	----	-----	Negativo
788	Ave	-----	----	-----	Negativo
789	Ave	-----	----	-----	Negativo
790	Choquinha-de-garganta-clara	<i>Myrmotherula huxwelli</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
791	Choquinha-de-asa-comprida	<i>Myrmotherula longipennis</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
792	Choca-preta-e-cinza	<i>Thamnophilus nigrocinereus</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
793	Choca-preta-e-cinza	<i>Thamnophilus nigrocinereus</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
794	Abre-asa-da-mata	<i>Mionectes macconnelli</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
795	Choca-preta-e-cinza	<i>Thamnophilus nigrocinereus</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
796	Tangará-falso	<i>Chiroxiphia pareola</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
797	Udu-de-coroa-azul	<i>Momotus momota</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
798	Tangará-falso	<i>Chiroxiphia pareola</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
799	Choca-preta-e-cinza	<i>Thamnophilus nigrocinereus</i>	24/07/2005	Mosqueiro-PA	Negativo
800	Rabo-branco-e-cinza	<i>Phaethornis hispidus</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
801	Rabo-branco-e-cinza	<i>Phaethornis hispidus</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
802	Rabo-branco-e-cinza	<i>Phaethornis hispidus</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
803	Pipira-vermelha	<i>Ramphocelus carbo</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
804	Papa-Formiga-pardo	<i>Formicivora grisea</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
805	Choca-lisa	<i>Thamnophilus aethiops</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
806	Garrinchão-pai-avô	<i>Thryothorus genibarbis</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
807	Garrinchão-pai-avô	<i>Thryothorus genibarbis</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
808	Guaracavuçu	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
809	Bico-chato-de-cabeça-cinza	<i>Tolmomyias poliocephalus</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
810	Papa-Formiga-pardo	<i>Formicivora grisea</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
811	Ave	-----	----	-----	Negativo
812	Papa-Formiga-pardo	<i>Formicivora grisea</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
813	Pipira-vermelha	<i>Ramphocelus carbo</i>	12/07/2005	Clemires-RO	Negativo
814	Curiango	<i>Nyctidromus albicollis</i>	13/07/2005	Clemires-RO	Negativo
815	Choca-de-olho-vermelho	<i>Thamnophilus schistaceus</i>	13/07/2005	Clemires-RO	Negativo
816	Uirapuru-laranja	<i>Pipra fasciicauda</i>	13/07/2005	Clemires-RO	Negativo
818	Pipira-vermelha	<i>Ramphocelus carbo</i>	13/07/2005	Clemires-RO	Negativo
819	Pipira-vermelha	<i>Ramphocelus carbo</i>	13/07/2005	Clemires-RO	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
820	Pipira-vermelha	<i>Ramphocelus carbo</i>	13/07/2005	Clemires-RO	Negativo
821	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
822	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
823	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
824	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
825	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
826	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
827	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
828	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
829	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
830	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
831	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
832	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
833	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
834	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
835	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
836	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
837	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
838	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
839	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
840	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
841	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
842	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Suspeita de Positividade
843	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
844	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
845	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
846	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
847	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
848	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
849	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
850	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
851	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
852	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
853	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
854	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
855	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
856	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
857	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
858	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
859	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
860	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
861	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
862	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
863	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
864	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
865	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
866	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
867	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
868	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
869	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
870	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
871	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
872	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
873	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
874	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
875	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	23/07/2005	Granja-Vera-Vigia-PA	Negativo
1749	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1750	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1751	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1752	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1753	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1754	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1755	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Suspeita de Positividade
1756	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1757	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1758	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1759	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1760	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1761	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1762	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1763	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1764	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1765	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1766	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1767	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1768	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1769	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1770	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1771	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1772	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1773	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1774	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1775	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1776	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1777	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1778	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1779	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1780	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1781	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1782	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1783	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1784	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1785	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1786	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1787	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1788	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1789	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1790	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1791	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1792	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1793	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1794	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1795	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1796	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1797	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1798	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1799	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1800	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1801	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1802	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1803	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Positivo
1804	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1805	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1806	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1807	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1808	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	Granja Beto- Terra Alta-PA	Negativo
1809	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1810	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1811	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1812	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1813	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1814	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1815	Galinha	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1816	Galinha	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1817	Peru	<i>Meliagres gallopavo</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1818	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	13/07/2006	D.Alda-Matupiri-PA	Negativo
1819	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1820	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Positivo
1821	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1822	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1823	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1824	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1825	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1826	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1827	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1828	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1829	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1830	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1831	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1832	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1833	Gaivota		14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1834	Pato selvagem	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1835	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Suspeita de positividade
1836	Garça-branca-pequena	<i>Egretta thula</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1837	Socó-Grande, maguari	<i>Ardea cocoi</i>	14/07/2006	S.Pará-São Caeta.Odivelas-PA	Negativo
1838	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1839	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1840	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1841	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1842	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1843	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1844	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1845	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1846	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
1847	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1848	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1849	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Negativo
1850	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	14/07/2006	Ruben Barbalho-Estr.Cach.PA	Suspeita de positividade
1851	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Pedro-Estr.S.Caet.Odivel as-PA	Negativo
1852	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Pedro-Estr.S.Caet.Odivel as-PA	Negativo
1853	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Pedro-Estr.S.Caet.Odivel as-PA	Negativo
1854	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Pedro-Estr.S.Caet.Odivel as-PA	Negativo
1855	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Pedro-Estr.S.Caet.Odivel as-PA	Negativo
1856	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	14/07/2006	Pedro-Estr.S.Caet.Odivel as-PA	Negativo
2308	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2309	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2310	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2311	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2312	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2313	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2314	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2315	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2316	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2317	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2318	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	29/10/2006	Santo Amaro-Breves-Marajó- PA	Negativo
2319	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2320	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2321	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2322	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2323	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2324	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2325	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2326	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2327	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2328	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2329	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2330	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2331	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2332	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2333	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2334	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	30/10/2006	Vila Galvão-Breves-Marajó-PA	Negativo
2335	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2336	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2337	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2338	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2339	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2340	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2341	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2342	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2343	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2344	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2345	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2346	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2347	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2348	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2349	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2350	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2351	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2352	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2353	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2354	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2355	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2356	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2357	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2358	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Tauaú-Breves-Marajó-PA	Negativo
2359	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2360	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2361	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2362	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2363	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2364	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2365	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2366	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2367	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2368	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2369	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Escola Emanuel-Breves-Marajó-PA	Negativo
2370	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Escola Emanuel-Breves-Marajó-PA	Negativo
2371	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Escola Emanuel-Breves-Marajó-PA	Negativo
2372	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2373	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2374	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2375	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2376	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	30/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2377	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2378	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2379	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2380	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2381	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2382	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2383	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2384	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2385	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2386	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2387	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2388	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2389	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2390	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2391	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2392	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	31/10/2006	Rio dos Macacos-Breves-Marajó-PA	Negativo
2393	Maçarico-de-papo-vermelho	<i>Calidris canutus</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2394	Trinta-réis-boreal	<i>Sterna hirundo</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2395	Trinta-réis-boreal	<i>Sterna hirundo</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo (Brasil) Positivo - PCR (EUA)
2396	Trinta-réis-boreal	<i>Sterna hirundo</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2397	Trinta-réis-boreal	<i>Sterna hirundo</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2398	Maçarico-pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2399	Maçarico-rasteirinho	<i>Calidris pusilla</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2400	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2401	Maçarico-pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2402	Maçariquinho	<i>Calidris minutilla</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2403	Maçarico-pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2404	Maçarico-pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2405	Maçarico-rasteirinho	<i>Calidris pusilla</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2406	Maçarico-rasteirinho	<i>Calidris pusilla</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2407	Maçarico-pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2408	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Positivo
2409	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Positivo
2410	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Positivo
2411	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2412	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Positivo
2413	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Positivo
2414	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2415	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2416	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2417	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2418	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2419	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2420	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2421	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2422	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2423	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2424	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2425	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2426	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2427	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2428	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2429	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2430	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2431	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2432	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2433	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2434	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2435	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2436	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2437	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2438	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2439	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2440	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2441	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2442	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2443	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2444	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2445	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2446	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	16/10/2006	Aquário de Santos-SP	Negativo
2447	Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	16/10/2006	Zoológico de São Paulo	Negativo
2448	Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	16/10/2006	Zoológico de São Paulo	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2449	Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	16/10/2006	Zoológico de São Paulo	Negativo
2450	Arara-azul-de-lear	<i>Anodorhynchus leari</i>	16/10/2006	Zoológico de São Paulo	Negativo
2510	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2511	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2512	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2513	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2514	Gaivota	<i>Larus sp.</i>	02/11/2006	Ilha de Canela-Bragança-PA	Negativo
2515	Maçarico-rasteirinho	<i>Calidris pusilla</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2516	Maçarico-rasteirinho	<i>Calidris pusilla</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2517	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2518	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2519	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2520	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2521	Maçarico Pintado	<i>Actitis macularia</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2522	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2523	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2524	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2525	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2526	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2527	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Suspeita de Positividade
2528	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo
2529	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2530	Batuíra-de-bando	<i>Charadrius semipalmatus</i>	03/11/2006	Praia de Ajuruteua-PA	Negativo

Apêndice C – Tabela das amostras testadas pelo método de PCR com visualização em gel de agarose.

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
971	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	25/07/2005	D. Cleonice- Vigia-PA	Negativo
972	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	25/07/2005	D. Cleonice- Vigia-PA	Negativo
973	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	25/07/2005	D. Cleonice- Vigia-PA	Negativo
974	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	25/07/2005	D. Cleonice- Vigia-PA	Positivo
975	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	25/07/2005	D. Cleonice- Vigia-PA	Positivo
1031	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1032	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1033	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1034	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1035	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1036	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1037	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1038	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Negativo
1039	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	25/07/2005	Isaura-Marabitaná-PA	Positivo
2393					
2394					
2395					
2396					
2397					
2398					
2399					

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2400					
2401					
2402					
2403					
2404					
2405					
2406					
2407					
2482	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2483	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2484	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Positiva
2485	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Positiva
2486	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2487	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2488	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2489	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2490	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2491	Pinguim-de-magalhães	<i>Spheniscus magellanicus</i>	23/10/2006	Aquário do Guarujá - SP	Negativo
2531	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	16/11/2006	Ararangua - SC	Negativo
2532	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	16/11/2006	Ararangua - SC	Negativo
2533	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	16/11/2006	Ararangua - SC	Negativo
2534	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	16/11/2006	Ararangua - SC	Negativo
2535	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	16/11/2006	Ararangua - SC	Negativo
2536	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	16/11/2006	Ararangua - SC	Negativo
2537	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	16/11/2006	Ararangua - SC	Negativo
2538	Maçarico-grande-de-perna-amarela	<i>Tringa melanoleuca</i>	17/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2539	Talha-mar	<i>Rynchops niger</i>	17/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2540	Quero-quero	<i>Vanellus chilensis</i>	17/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2541	Talha-mar	<i>Rynchops niger</i>	17/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2542	Talha-mar	<i>Rynchops niger</i>	17/11/2006	Tijuca - SC	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2543	Caminheiro-zumbidor	<i>Anthus lutescens</i>	17/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2544	Ganso		18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2545	Ganso	-----	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2546	Ganso	-----	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2547	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2548	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2549	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2550	Galinha-d'angola	<i>Numida meleagris</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2551	Galinha-d'angola	<i>Numida meleagris</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2552	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2553	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2554	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	18/11/2006	Tijuca - SC	Negativo
2555	Pato silvestre	<i>Anas sp.</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2556	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2557	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2558	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2559	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2560	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2561	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2562	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2563	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2564	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2565	Galinha	<i>Gallus gallus</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2566	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2567	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2568	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2569	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2570	Pato doméstico	<i>Cairina moschata</i>	18/11/2006	Barra Velha - SC	Negativo
2571	Ganso	-----	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2572	Ganso	-----	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2573	Ganso	-----	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2574	Ganso	-----	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2575	Ganso	-----	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2576	Pato silvestre	<i>Anas sp.</i>	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2577	Pato silvestre	<i>Anas sp.</i>	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2578	Pato silvestre	<i>Anas sp.</i>	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2579	-----	-----	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo
2580	-----	-----	18/11/2006	Navegantes - SC	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2579 - repetido	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2580 - repetido	Paturi-preta	<i>Netta erythrophthalma</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2581	Paturi-preta	<i>Netta erythrophthalma</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2582	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2583	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2584	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2585	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2586	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2587	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2588	Frango-d'água-comum	<i>Gallinula chloropus</i>	10/04/2007	São Bento - MA	Negativo
2589	Pé-vermelho	<i>Amazonetta brasiliensis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2590	Pé-vermelho	<i>Amazonetta brasiliensis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2591	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2592	Marreca-toicinho	<i>Anas bahamensis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2593	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2594	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2595	Marreca-toicinho	<i>Anas bahamensis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2596	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2597	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2598	Frango-d'água-comum	<i>Gallinula chloropus</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2599	Marreca-toicinho	<i>Anas bahamensis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2600	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2601	Pé-vermelho	<i>Amazonetta brasiliensis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2602	Pé-vermelho	<i>Amazonetta brasiliensis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2603	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2604	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento - casa do Padeiro-MA	Negativo
2605	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-irmão do Ademar-MA	Negativo
2606	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-irmão do Ademar-MA	Negativo
2607	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-irmão do Ademar-MA	Negativo
2608	Peru	<i>Meleagris gallopavo</i>	11/04/2007	São Bento-irmão do Ademar-MA	Negativo
2609	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2610	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2611	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2612	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2613	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2614	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2615	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2616	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	11/04/2007	São Bento-secretário da Agricultura-MA	Negativo
2617	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Bacurituba-(Seu Maruim)-MA	Negativo
2618	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Bacurituba-(Seu Maruim)-MA	Negativo
2619	Marreca-cablocá	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Bacurituba-(Seu Maruim)-MA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2620	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	12/04/2007	Bacurituba- (vizinha do Maruim)-MA	Negativo
2621	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	12/04/2007	Bacurituba- (vizinha do Maruim)-MA	Negativo
2622	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	12/04/2007	Bacurituba- (vizinha do Maruim)-MA	Negativo
2623	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	São Bento- centro- MA	Negativo
2624	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	São Bento- centro- MA	Negativo
2625	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	São Bento- centro- MA	Negativo
2626	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	São Bento- centro- MA	Negativo
2627	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	São Bento- centro- MA	Negativo
2628	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2629	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2630	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2631	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2632	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2633	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2634	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2635	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2636	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2637	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2638	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2639	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2640	Marrecabloca	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2641	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2642	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2643	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2644	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2645	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2646	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2647	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2648	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2649	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2650	Irerê	<i>Dendrocygna viduata</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2651	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2652	Marreca-cablocas	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	12/04/2007	Cajapió-MA	Negativo
2653	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2654	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2655	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2656	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2657	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2658	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2659	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2660	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2661	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2662	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2663	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2664	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2665	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2666	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2667	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2668	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2669	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2670	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2671	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2672	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2673	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo

Nº da Amostra	Nome Popular	Nome Científico	Data da Coleta	Local	Resultado
2674	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2675	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2676	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2677	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2678	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo
2679	Maçarico	-----	19/04/2007	Recife - PE	Negativo