CAROLINA DE SOUZA FERREIRA

**CIRCULAÇÃO DO VÍRUS DA INFLUENZA A EM PATOS
DOMÉSTICOS DA REGIÃO AMAZÔNICA ATRAVÉS DA
DETECÇÃO DE ANTICORPOS UTILIZANDO O MÉTODO DE
INIBIÇÃO DA HEMAGLUTINAÇÃO (HI)**

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

Área de Concentração:

Microbiologia

Orientador:

Prof. Dr. Edison Luiz Durigon

São Paulo
2010

RESUMO

Ferreira, C.S. *Circulação do vírus Influenza A em patos domésticos da região amazônica através da detecção de anticorpos utilizando o método de Inibição da Hemaglutinação (HI)*.2010. 89f Dissertação (mestrado em biotecnologia). São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

A avicultura brasileira é atualmente uma atividade de grande sucesso. A utilização de sistemas de planejamento associados a novas tecnologias, reflete-se no extraordinário crescimento da atividade. A produção brasileira de frango ultrapassou a marca anual de 11 milhões de toneladas, em 2009. O Brasil está entre os três maiores produtores de frango no ranking mundial, junto com Estados Unidos e China. Haja vista a importância que a avicultura representa para o país, pela geração de benefícios sociais e econômicos, o risco que a Influenza aviária constitui para a avicultura brasileira é enorme. Um surto desta doença em um centro de produção avícola representaria um risco à economia e incidiria de forma negativa nos níveis de consumo de proteína de qualidade e economicamente acessível à população. A fim de estabelecermos um monitoramento do vírus da Influenza A em aves domésticas não vacinadas, residentes em regiões de elevada confluência migratória aviária no Brasil a região amazônica, para a realização deste trabalho se fez necessário a colheita de sangue para o teste sorológico indicado como padrão em todo o mundo para detectar anticorpos contra o vírus da influenza, tendo como objetivos maiores, contribuir para o fortalecimento dos serviços de defesa sanitária animal, aumentar a capacidade de investigação, e finalmente, atualizar e harmonizar normas e procedimentos para a prevenção e controle da Influenza A, referenciando-se nas recomendações da Organização Mundial de Sanidade Animal (Office International des Epizooties - OIE). Das 1051 aves amostradas em diferentes localidades da região norte do Brasil, 1010 soros foram testados para seis diferentes subtipos virais: H2;H3;H5;H6;H7 e H9, pela técnica sorológica da Inibição da Hemaglutinação (HI). Destas, MAIS DE 50% apresentaram positividade para um subtipo viral testado, no entanto todos os soros apresentaram negatividade no centro de referência mundial em sorologia de Influenza, St. Jude Children's Research Hospital localizado em Memphis, EUA. O antagonismo dos resultados levanta a discussão da metodologia adotada como padrão em todo mundo, o que nos levou a otimizar a técnica, vislumbramos a diferença ao compararmos os resultados do ano de 2005 e do ano de 2006, o primeiro ano obtivemos 50% de positividade nas amostras, já no ano seguinte esta positividade cai para aproximadamente 0,2%. Com este resultado podemos inferir que a técnica foi adequadamente otimizada, corroborando as informações de que o Brasil é livre de Influenza aviária em patos domésticos na região amazônica.

Palavras-chave: Influenza aviária. Técnica sorológica (HI). Vigilância Epidemiológica.

ABSTRACT

FERREIRA, C.S. *Circulation of influenza A viruses in domestic ducks in the Amazon region by detecting antibodies using the method the Hemagglutination Inhibition*. 2010 89 f (MATER tesis) São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

The Brazilian poultry industry is currently a very successful activity. The use of planning systems associated with new technologies, reflected in the extraordinary growth in activity. The Brazilian production of chicken surpassed the annual 11 million tonnes in 2009. Brazil is among the three largest poultry producers in the world ranking, along with the United States and China. Given the importance of poultry production for the country, the generation of social and economic benefits, the risk that avian influenza poses to the Brazilian poultry industry is huge. An outbreak of this disease in a poultry-production pose a risk to the economy and impinge negatively on levels of consumption of protein quality and affordable to the population. In order to establish a monitoring of influenza A viruses in poultry unvaccinated residents in regions of high avian migratory confluence in Brazil the Amazon region, for this work was required the collection of blood for serological testing indicated as standard worldwide to detect antibodies against influenza viruses, with the larger goals, contribute to the strengthening of animal health protection services, increase research capacity, and finally, update and harmonize standards and procedures for the prevention and control Influenza A, referencing the recommendations of the World Organization for Animal Health (Office International des Epizooties - OIE). From 1051 birds sampled in different localities of northern Brazil, 1010 sera were tested for six different viral subtypes: H2, H3, H5, H6, H7 and H9, the serological technique the hemagglutination inhibition (HI). Of these, over 50% were positive for one viral strain tested, but all sera were negative in the center of world reference serology Influenza, St. Jude Children's Research Hospital located in Memphis, USA. The antagonism of the results raise the discussion of the methodology adopted as standard throughout the world, which has led us to optimize the technique, we can see the difference when comparing the results of 2005 and 2006, the first year we had 50% positivity in the samples, in the following year this positive drops to about 0.2%. With this result we infer that the technique was properly optimized, corroborating the information that Brazil is free from avian influenza in domestic ducks in the Amazon region.

Word key: Avian Influenza. Serological technique (HI). Epidemiological Surveillance.

1 INTRODUÇÃO

O vírus da influenza é responsável por epidemias de doença respiratória aguda de alto contágio, podendo causar também epidemias de alcance global denominada pandemia. Anualmente mais de 10% da população mundial, cerca de 600 milhões de pessoas são acometidas pelo vírus da gripe. Em junho de 2009 foram registrados 55.867 casos de gripe em todo mundo e destes, 238 vieram a óbito (GERDIL, 2003; BROCKWELL-STAATS, 2009).

1.1 Histórico

Os primeiros relatos de uma doença, com aspectos muito semelhantes ao quadro clínico do que hoje chamamos de gripe datam de 2500 a.C. no Egito, com a descrição de sintomas de febre, mialgia e prostração no Faraó, após seu retorno de uma viagem. Os chineses em 500 a.C. nos tempos de Lao-tse e Confúcio também descreveram sintomatologia semelhante. A primeira descrição científica da influenza ou gripe foi em 412 a.C. na Grécia, onde Hipócrates relatou uma doença respiratória que durou algumas semanas, que acometeu o exército ateniense (HOEHLING, 1961).

Francisco Guerra, historiador da medicina, considerou em seus estudos a possibilidade da transferência de patógenos do Velho Mundo para o Novo Mundo, devido as expedições marítimas. Guerra foi a primeira pessoa a descrever as enfermidades e as causas de mortalidade nas viagens de Colombo, principalmente após o termino de sua segunda viagem em 1493, onde foi documentada a morte de milhares de pessoas a bordo das caravelas, além da morte de índios nativos o Panamá (COOK, 2003).

O primeiro relato epidêmico foi descrito em janeiro de 1494, por Cristóvão Colombo e Alvarez Chanca, o qual descreveu uma sintomatologia muito semelhante aos sinais clínicos da gripe (COOK, 2003).

O termo influenza foi introduzido na Itália no início do século XV, para descrever uma epidemia atribuída a influência das estrelas. O mesmo termo foi adotado pelos ingleses no século XVIII, e nesta mesma época os franceses denominaram a enfermidade como “La grippe” (TALAVERA, 1999).

A primeira pandemia conhecida no séc. XVIII, ocorreu em 1729 na Rússia e se alastrou por toda a Europa por aproximadamente seis meses. Em 1889 houve outra

pandemia na Europa e Ásia, onde a estimativa de mortos ultrapassou 300 mil pessoas, mas foi em 1918 que a gripe ficou mais conhecida e descrita devido a gravidade da doença. Estima-se que 50% da população mundial tenha contraído o vírus e que 25% tiveram de fato manifestações clínicas e morte (NETO e TAUBENBERGER, 2001).

O século XX testemunhou três pandemias de influenza, a primeira pandemia ficou conhecida como a gripe espanhola provocada pelo subtipo viral H1N1 em 1918, embora a Espanha tenha sido um dos últimos países a ser atingido a origem do surto não é bem conhecida, mas possivelmente ela tenha surgido na China, e causou cerca de 20 milhões de mortes em todo o mundo. A segunda pandemia ficou conhecida como a gripe asiática, provocada pelo subtipo viral H2N2, em fevereiro de 1957 que teve início na China e rapidamente se alastrou para Hong Kong, Cingapura, Taiwan e Japão e em cerca de seis meses teve um alcance global, foi contabilizado aproximadamente um milhão de óbitos. E por fim a última grande pandemia do século XX foi a gripe de Hong Kong provocada pelo H3N2 em 1968, com 500 mil casos. (TALAVERA et al., 2009).

Uma das mais recentes ameaças de pandemia de influenza ocorreu em 1997, com a gripe aviária, em Hong Kong, onde 18 pessoas foram hospitalizadas, e destas, 6 vieram a óbito. A doença foi causada por um subtipo antigênico H5N1, anteriormente detectado apenas em aves. Até então o vírus não era transmissível de pessoa a pessoa, sendo que os indivíduos infectados conviviam com aves supostamente contaminadas. Com a finalidade de se evitar uma pandemia foram sacrificados 1,5 milhões de frangos (CLASS e SUBBARAO, 1998).

No ano de 2009 uma nova cepa patogênica, o H1N1 de origem suína surgiu com potencial de causar a primeira pandemia do século XXI. Em outubro deste mesmo ano a OMS reportou somente no continente europeu mais de 414000 casos acarretando em aproximadamente 5000 mortes (WHO, 2009). Os primeiros casos de pacientes brasileiros infectados pelo influenza A (H1N1), que causa a gripe suína, foram diagnosticados no início do mês de maio deste ano em território nacional,

quando os laboratórios e órgãos de saúde pública no Brasil receberam, do Centro para Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (CDC), os kits de biologia molecular “Real Time PCR” para o diagnóstico de pessoas infectadas pelo vírus no país.

O novo vírus pandêmico da gripe do ano de 2009 é do tipo A, que foi denominado pela OMS como influenza A (H1N1). Os diferentes subtipos da gripe são definidos em função das proteínas do envelope viral, possuindo dois tipos de proteínas de superfície: a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N). A denominação H1N1 corresponde a uma mistura de duas cepas suínas, uma aviária e uma humana, corresponde, portanto, à hemaglutinina de tipo 1 e à neuraminidase de tipo 1 (MARTINS, 2001 e BROCKWELL-STAATS, 2009).

1.1.2 Histórico do vírus da Influenza aviária no Brasil

O sistema de vigilância implementado pelo Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), mantém um monitoramento permanente das principais aves domésticas e selvagens, como por exemplo: galinhas (*Gallus gallus domesticus*); perus (*Melagres gallopavo*); codorna (*Coturnix coturnix japônica*); patos (*Anas*); avestruzes (*Struthio camelus*) e emas (*Rhea americana*) (MARTINS, 2001).

Em São Paulo nos anos de 1971 e 1976, Aranku apud Kawamoto, demonstrou a presença de gripe, através de estudos sorológicos em aves silvestres nativas, migratórias e frangos domésticos que apresentavam anticorpos contra a cepa A/DUCK/56. No Rio de Janeiro em 1980 foram isolados os subtipos H6N2 e H1N4, de patos silvestres *Dendrocygna viduata*, e de aves exóticas (SALCEDO e KAWAMOTO, 2005).

Entre os anos de 1997 e 1998 um estudo epidemiológico realizado no estado de São Paulo detectou a presença do vírus da Influenza A em passeriformes silvestres (*Vireo olivaceus* e *Elaenia mesoleuca*) que realizam efetiva migração entre o hemisfério norte e hemisfério sul. Estes achados demonstram a necessidade de monitorar aves migratórias e residentes em nosso território (KAWAMOTO, 2005).

1.2 Reservatório natural do vírus da Influenza A

O vírus da influenza A infecta uma variedade de animais (figura 1), incluindo humanos, suínos, cavalos, mamíferos marinhos e aves. Foi demonstrado que as aves aquáticas da ordem dos anseriformes são fonte de todos os subtipos do vírus influenza, o que caracteriza estes animais como hospedeiro natural da doença dentre estas aves, podemos citar os patos e marrecos, importantes aves migratórias que habitam lagos (WEBSTERL, 1992).

Ao migrar, esses animais silvestres podem transportar consigo cepas virais que podem ser transmitidas para aves comerciais e vice e versa, causando prejuízos econômicos, a complexidade do processo de transmissão do vírus da Influenza aviária VIA, tornam a vigilância dessa doença um grande desafio. Anatídeos domésticos e selvagens, especialmente marrecas do gênero *Anas*, são comumente portadores de vários subtipos de VIA, e frequentemente a infecção é inaparente, podendo ser causada por um ou mais subtipos simultâneos, acarretando infecções mistas (JHNOSON e MAXFIELD, 1976; OLIVEIRA, 2001).

Stallknecht e Marrom sugeriram três hipóteses para a transmissão e a manutenção do vírus da influenza Aviária (AIV) em seus reservatórios naturais:

- 1) o vírus permanece em altos títulos por um longo período de tempo;
- 2) estabilidade ambiental;
- 3) o título exigido para uma efetiva infecção a um novo hospedeiro é relativamente baixo (SPACKMAN, 2009).

Figura 1- Ciclo de manutenção do vírus da Influenza A.

1.3 Rotas migratórias aviárias

No sentido amplo, o termo migração é frequentemente utilizado para os movimentos direcionais em massa de um grande número de indivíduos de uma determinada espécie de uma localidade para outra (BEGON, et al., 1990). A migração se caracteriza pelo deslocamento realizado anualmente e que se repete, por uma determinada população animal, que se desloca da sua área de reprodução para as áreas de alimentação e descanso, em uma determinada época do ano, retornando a sua área de reprodução original (ALERSTAM e HEDENSTRÖM, 1998).

As rotas migratórias aviárias são agrupadas e denominadas como “flyways” (Figura 1) para facilitar os esforços internacionais de manejo e conservação. Uma flyway pode ser definida como “a completa extensão na qual uma espécie migratória aviária (ou grupos, ou espécies relacionadas, ou populações distintas de uma mesma espécie) se locomovem anualmente de uma área de reprodução para uma área de não-reprodução, incluindo lugares intermediários de descanso

e alimentação, bem como áreas de ocorrência das mesmas” (BOERE; STROUD, 2006).

A porção norte do Brasil é a porta de entrada dos migrantes setentrionais no país. Dessa forma, a Amazônia e zona costeira da região norte e nordeste são locais com muitos registros de espécies migratórias do hemisfério norte. Essas aves chegam ao país entre agosto e outubro e retornam para suas áreas de origem entre março e maio (HARRINGTON, 1986).

Todo ano, com a aproximação da primavera ou outono, milhões de aves deixam suas frias áreas de reprodução em busca de locais com temperaturas mais amenas e com maior disponibilidade de alimento (áreas de invernada), para depois retornarem às suas áreas de origem durante a primavera e verão, completando assim seu ciclo biológico. Muitas espécies de aves migratórias, tanto de visitantes setentrionais (aves Neárticas), que possuem seus sítios de reprodução no hemisfério norte, como meridionais (aves Neotropicais), que reproduzem em áreas do hemisfério sul, migram para a região Neotropical, porque nos trópicos há maior abundância de alimentos, em contraste com o rigoroso outono e inverno dos países situados nos extremos dos hemisférios, nos quais os territórios, em grande parte, ficam cobertos por gelo.

Algumas espécies de aves migratórias permanecem em nosso país durante todo o período de invernagem; outras têm no Brasil como um ponto de parada e continuam suas migrações até o extremo sul do continente sul-americano, neste período descansam, realizam a troca de penas e se alimentam. Algumas espécies de maçaricos e batuíras, por exemplo, chegam a realizar trajetos de cerca de dez mil quilômetros entre suas áreas de origem e o nosso país, aqui chegando com cerca de metade de seu peso original (SICK, 1997).

Os habitats selecionados pelas aves migratórias ao longo de suas rotas são diversos e estão relacionados aos hábitos alimentares, disponibilidade de recursos e táticas de forrageamento. Devido à distribuição não-contínua desses recursos, as espécies migrantes geralmente se concentram em áreas específicas. Esses locais têm importância fundamental para conservação dessas espécies, uma vez que, ao realizarem grandes migrações, elas necessitam de áreas chave para trocarem as penas, se alimentarem e adquirirem as reservas energéticas necessárias para a continuação das longas viagens. (CENTRO NACIONAL DE PESQUISA PARA CONSERVAÇÃO DAS AVES SILVESTRES, 2006).

Figura 2- Principais rotas migratórias (“flyways”) de aves que se deslocam entre as áreas de reprodução no verão e as áreas de invernada, ligando os hemisférios norte e sul. Fonte: BOERE e STROUD (2006).

Um estudo, realizado no estado de São Paulo, acompanhou entre os anos de 1966 a 1997, o comportamento migratório de *Vireo olivaceus*, popularmente conhecido como Jururiara-Norte-Americano, demonstrando que esta ave possui ampla distribuição geográfica nas Américas, migrando de um hemisfério para o outro e entrando no Brasil pela região Amazônica nos meses de agosto até o fim de março (PEREIRA et al., 1998). O vírus da Influenza Aviária foi isolado em espécimes de *Vireo olivaceus* capturados na Mata Atlântica nos meses de novembro a janeiro, de 1998, sugerindo a possibilidade destas aves carregarem vírus de um continente a outro (KAWAMOTO et al., 2005).

1.4 Impacto econômico

A avicultura brasileira é atualmente uma atividade de grande sucesso, com um elevado status sanitário. O Brasil lidera o ranking de exportação desde 2004, sendo o maior exportados de carne de frango do mundo (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS EXPORTADORES DE FRANGO, 2009).

O ano de 2008, o Brasil exportou 3,6 milhões de toneladas de carne de frango, registrando um crescimento de 10,9% em relação a 2007. Esses números são crescentes e positivos, considerando a inesperada crise econômica que abateu sobre os cinco continentes em outubro de 2008, quando a produção mundial de carne de frango registrou crescimento de 4,5%, pouco abaixo dos 6,2% registrados em 2007, totalizando 71,2 milhões de toneladas, segundo dados do United States Department of Agriculture (USDA).

No setor de produção, o Brasil segue no terceiro lugar do ranking, com 10,9 milhões de toneladas, precedido pela China, com 11,9 milhões de toneladas, e Estados Unidos, em primeiro lugar, com seus 16,6 milhões de toneladas, (Figura 3).

Figura 3- Produção Mundial de Carne de Frango em 2009

Já no setor de exportação no que se refere a volume individual, o Brasil lidera o ranking com 3,6 milhões de toneladas exportadas, registrando um crescimento de 10,9%. Estados Unidos e União Européia mantiveram-se em 2º e 3º lugares, com volumes de 3,2 e 0,7 milhões de toneladas respectivamente (Figura 4). Para a China, o ano de 2008 terminou em vermelho com uma queda de 20,4% nos embarques, com uma redução de 0,7 milhão em relação ao ano anterior (ABEF, 2009).

Figura 4- Exportação Mundial de Carne de Frango em 2009.

A importância da criação do frango não se resume ao setor econômico, mas se estende na área da saúde, visto que a carne do frango apresenta rico teor de proteínas de boa qualidade, é recomendado o consumo em todas as idades e pode ser consumida por pessoas com riscos cardiovasculares, devido a baixa taxa de colesterol. Na realidade, a carne de aves constitui uma importante fonte protéica de boa qualidade pois é rica em aminoácidos indispensáveis. A carne branca apresenta basicamente os mesmos nutrientes da carne vermelha. Além disso, a carne de frango é rica em ferro hemínico, forma do ferro que é melhor assimilada pelo organismo, além de ser considerada fonte importante de vitaminas do complexo B, principalmente B2 e B12 (VENTURINI, 2007).

Devemos considerar ainda, que para muitos brasileiros sobretudo na região Norte e Nordeste, as aves de “fundo de quintal”, representados por

frangos, patos e perus, representam uma fonte extremamente importante de alimento na forma de ovos e carne (THOMAZELLI, 2009).

1.5 Sintomas da doença em diferentes animais

Em humanos a sintomatologia clássica da gripe manifesta-se com febre, dores musculares, tosse, dor de cabeça, irritação na garganta e secreções nasais. Os sintomas podem depender da idade do doente, de seu estado geral de saúde e do “status” imunológico no que se refere a infecções anteriores. Também pode evoluir para complicações como pneumonia, causada pela propagação viral no epitélio alveolar e/ou pneumonia bacteriana (WHO, 1999).

Em cavalos o vírus da influenza circula por séculos, mas o primeiro isolamento do vírus foi feita em 1956. Dois subtipos de influenza A (H7N7 e H3N8), tem sido identificados em cavalos, estes vírus são conhecidos como vírus eqüino 1 e vírus eqüino 2 respectivamente. Os sintomas apresentados pela infecção viral de ambos são semelhantes: tosse seca, febre, dores musculares e inflamação do músculo cardíaco. Estudos filogenéticos indicam que o gene codificante da proteína H3 eqüino foi introduzido em cavalos por vírus infectante de aves. Análises similares demonstraram a troca de genes virais em transmissões intra e inter-específica, como por exemplo a transmissão do vírus de suínos para outras espécies.(WEBSTER et al., 1992).

A Influenza em suínos foi pela primeira vez observada nos EUA durante a pandemia de 1918. Estas informações indicam que os suínos servem de maior reservatório para os subtipos H1N1 e H3N2, e que são freqüentemente envolvidos em transmissões interespecíficas do vírus (WEBSTER et al., 1992). Os suínos apresentam sintomas similares aos seres humanos, tais como: tosse, febre, e coriza.

Os sintomas em aves incluem desde infecção subclínica, doença branda respiratória das vias superiores a doença fatal generalizada em aves domésticas (Martins, 2001). Foram constatados concomitantemente alterações no sistema digestório, nervoso e reprodutivo, com decréscimo do consumo de alimento e produtividade, lacrimejamento, edema na face e cabeça, cianose e diarreia (EASTERDAY e HINSHAW, 1997). As manifestações clínicas da doença associadas com infecções do vírus da influenza A, podem mudar consideravelmente de espécie

de aves com a linhagem do vírus. Aves contaminadas com o vírus da influenza aviária de alta patogenicidade, como o H5N1, apresentam sinais clínicos de febre, dispnéia, depressão, diarreia e sinais nervosos tais como ataxia, descordenação motora, convulsões e conjuntivite com congestão nasal (WEBSTER et al., 2006).

A cepa H5N1 considerada de alta patogenicidade foi detectada primeiramente no ano de 1996 em gansos na China (TANG et al., 1998), demonstrando ter um grande potencial de disseminação, quando contaminando patos das províncias do litoral Sul da China (CHEN et al., 2004). Há registros de que este mesmo vírus contaminou aves dos mercados de animais domésticos de Hong Kong (SIMS et al., 2005). Em 1997, este vírus infectou pelo menos 18 pessoas em Hong Kong, onde 6 vieram a óbito (BRIDGS et al., 2002).

A maioria dos casos humanos resultaram da transmissão direta do vírus das aves domésticas aos seres humanos (CHOTPITAYASUNONDH et al., 2005). No entanto, foi constatado que ele transmitiu-se de pessoa a pessoa no Vietnã, Tailândia, Cambodia e na Indonésia (LI et al., 2004). O seqüenciamento viral do H5N1 provenientes de 18 pacientes evidenciaram que as cepas causadoras deste surto são de origem aviária (SUBBARAO e SHAW, 2000).

1.6 Classificação geral do vírus

Os vírus da influenza pertencem a família *Orthomyxoviridae* que é composta de 5 gêneros: *Influenzavírus A*, *Influenzavírus B*, *Influenzavírus C*, *Thogotovírus* e *Isavírus* (Trabulsi, 2005). A classificação em tipos A, B e C baseou-se no antígeno interno nucleoprotéico (COX e BENDER, 1995). O vírus da Influenza A é dividido em subtipos baseados em duas glicoproteínas presentes na superfície do vírus: a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), (WEBSTER et al., 1997).

A classificação dos vírus da família *Orthomyxoviridae* compõe-se de informações separadas por barras verticais, que incluem o tipo (A, B ou C)/ espécie animal/ localização geográfica/ número de referência do laboratório/ ano de isolamento. Quando o vírus é de origem humana esta informação não entra na nomenclatura, exemplo: A/Brazil/013/00, B/Brazil/017/00 ou A/chicken/Alabama/7395/75. Entretanto, as informações sobre virulência não estão incluídas na nomenclatura. (MARTINS, 2001).

Os subtipos virais do tipo A são classificados de acordo com as características sorológicas de suas duas glicoproteínas de superfície, a hemaglutinina (HÁ) e a neuraminidase (NA). Foram descritos 16 subtipos de HÁ, denominados de H1 até H16 e 9 subtipos de NA, denominados de N1 até N9 (WEBSTER et al., 1997 e FOUCHIER et al., 2005).

1.7 Genética viral

Os Ortomixovírus apresentam morfologia esférica ou pleomórfica, com o diâmetro de aproximadamente 80 a 120 nm de, no entanto podemos encontrar nas novas cepas isoladas, partículas virais filamentosas. A composição viral é de 0,8 a 1,0% de RNA, 70% de proteínas, 20% de lipídeos e 5 a 8% de carboidratos. (LAMB; CHOPPIN; ROBERTS, 1998).

O genoma viral do Influenza A é composto por oito segmentos de RNA de fita simples e de polaridade negativa (-ssRNA) (MCGEOCH, 1976; DESSELBERGER, 1980; KLUMPP, 1997). O genoma completo do Influenza A é composto por aproximadamente 13.600 nucleotídeos (RICHTMAN; WHITNEY; HAYDEN, 1997). Nos oito segmentos de RNA estão localizados dez genes que codificam 10 proteínas diferentes:

Proteína Básica 2- PB2 (produto do segmento 1);

Proteína Básica 1-PB1 (produto do segmento 2);

Proteína Ácida-PA (produto do segmento 3);

Hemaglutinina-HÁ (produto do segmento 4);

Núcleo Proteína-NP (produto do segmento 5);

Neuraminidase-NA (produto do segmento 6);

Proteínas de membrana- M1 e M2 (produto do segmento 7);

Proteínas não Estruturais- NS1 e NS2 (produto do segmento 8) (COX; BENDER, 1995).

Figura 5- Modelo estrutural do vírus da influenza do tipo A. Fonte: de KAISER, (2006).

O vírus da Influenza A, é composto por oito segmentos de RNA, envolto por uma matriz protéica constituída pela proteína M1, a qual é envolvida por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira durante o processo de brotamento (KATES, 1962; LAMB e CHOPPIN, 1983; BRAAKMAN e ANKEN, 2000) e duas glicoproteínas de superfície, codificadas pelo genoma viral e que se projetam através da bicamada lipídica, denominadas de HA e NA. Dessas. A hemaglutinina (HA) é a glicoproteína mais abundante, apresenta-se na forma de bastão e é sintetizada no retículo endoplásmico granular. As principais funções da Hemaglutinina (HA) são:

- Ligar-se ao receptor contendo ácido siálico na superfície da célula hospedeira proporcionando a adsorção da partícula viral à célula;
- Penetração do vírus através das membranas citoplasmática, intermediando a fusão do envelope da partícula endocitada com a

membrana endossomal resultando na liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma;

- É o principal antígeno viral contra o qual o hospedeiro desenvolve anticorpos neutralizantes (SUZUKI et al., 2000).

A neuraminidase (NA), presente em menores quantidades, apresenta-se na forma de cogumelo. Ainda, uma terceira proteína, formadora de canais e denominada de M2, encontra-se inserida na bicamada lipídica (ZEBEDEE e LAMB, 1988; PARK et al., 1998; MOULD et al., 2000). As proteínas PB1, PB2 e PA compõem a polimerase viral, possuem atividade de transcriptase e estão intimamente associadas ao RNA genômico do vírus (YAMASHITA et al., 1989; HAY, 1998; CRESCENZO-CHAIGNE et al., 1999).

Há 16 tipos diferentes de hemaglutinina (HA) e nove tipos diferentes de neuraminidase (NA) que podem ser encontrados entre os vírus da influenza A, todos os tipos de HA reconhecem cadeias de açúcares da série sialil-lactose tipo I e II (ácido siálico). Os diferentes ácidos siálicos nas membranas resultam em diferentes permeabilidades aos variantes, por exemplo:

Estirpes de aves e eqüinos, ligam-se ao receptor: 3 Gal (SA2-3 Gal);

Estirpes de humanos ligam-se ao receptor: SA2-6 Gal;

A traquéia de suínos tem ambos os receptores de aves e de humanos. A distribuição do ácido siálico nas membranas celulares das espécies de animais influenciam o aspecto do hospedeiro (MARTINS, 2001).

1.8 Evolução do vírus Influenza A

Linhagens separadas de VIA (vírus da influenza aviária), baseadas em estudos da NP e outros genes foram determinadas para estirpes de animais da América, Europa e Ásia. Esta distinção está associada à migração de aves aquáticas principalmente no sentido norte-sul nestes continentes e não leste-oeste. Aves que migram no sentido da longitude tem um importante papel na continuidade na evolução do vírus da influenza (WEBSTER et al., 1992).

A gripe usualmente ocorre em epidemias com rápida expansão geográfica, surgindo em focos e, podendo atingir proporções mundiais, quando são então denominadas pandemias (BRIDGES et al., 2003). Dois mecanismos principais são responsáveis pela mudança contínua na antigenicidade dos vírus da influenza A, e são denominados “shift” antigênico e “drift” antigênico (ZAMBON, 1999).

O “drift” antigênico é uma alteração antigênica gerada por mutações pontuais e cumulativas nos genes de HA e NA. O “drift” antigênico ocorre como parte da evolução contínua dos vírus da influenza. Esse processo gera novas linhagens de vírus capazes de escapar à neutralização por anticorpos gerados contra linhagens que circulavam anteriormente (BRIDGES et al., 2003). Epidemias anuais ou bienais ocorrem durante o período intra-pandêmico, pois um número suficiente de indivíduos na população é suscetível à linhagem variante gerada (LIN et al., 1999). A alteração de um único resíduo de aminoácido em HA1 pode resultar em alterações estruturais, permitindo ao vírus mutante escapar à neutralização pelos anticorpos gerados em processos infectivos anteriores (KNOSSOW et al., 1984; NAKAJIMA et al., 2000).

Cinco sítios de maior variabilidade no domínio globular da subunidade HA1 foram identificados (WILEY e SKEHEL, 1987). Estes sítios, designados A, B, C, D e E correspondem a regiões expostas na superfície de HA1, e próximas ao sítio de ligação ao receptor (WILEY et al., 1981). Variações nesses mesmos sítios foram identificadas, quando variantes antigênicos foram gerados pelo crescimento de linhagens na presença de anticorpos monoclonais sabidamente neutralizantes (WILEY e SKEHEL, 1987; BUSH et al., 1999). Assim, os sítios de maior variabilidade correspondem, pelo menos em parte, às regiões de ligação dos anticorpos neutralizantes, o que poderia explicar o escape dos variantes gerados aos anticorpos produzidos numa infecção anterior.

O “shift” antigênico pode ser definido como o aparecimento de um novo vírus influenza tipo A contendo um novo subtipo de HA ou HA e NA, os quais são imunologicamente distintos dos vírus influenza circulantes nas últimas décadas. O “shift” antigênico ocorre quando vírus de influenza animal, que normalmente infecta reservatórios aviários ou suínos e, que não esteja relacionado ao vírus da influenza que circulam no momento na população humana, é transmitido para o homem (WEBSTER et al., 1987; FERGUSON et al., 2003).

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, refere-se ao reagrupamento dos segmentos

genômicos de vírus influenza humana e vírus influenza animal, durante a co-infecção de uma mesma célula hospedeira (COX e SUBBARAO, 2000). Como exemplos de “shift” podem-se citar as pandemias de 1957 e 1968 (NGUYEN-VAN-TAM e HAMPSON, 2003).

A pandemia de 1957 foi gerada pela incorporação de segmentos genômicos aviários que codificam para a HA, NA e PB1 em vírus da influenza humana circulantes. Em 1968, os segmentos genômicos de HA e PB1 originários de aves foram introduzidos em vírus da influenza humana circulantes. (KAWAOKA et al., 1989; LAVER e WEBSTER 1973).

O segundo mecanismo para o surgimento de linhagens pandêmicas é a transmissão direta de um hospedeiro natural para o homem (COX e SUBBARAO, 2000). Esse fenômeno foi observado no episódio ocorrido em Hong-Kong, em 1997, onde o vírus da influenza aviária do subtipo H5N1 foi transmitido de aves migratórias para patos por meio de contaminação da água por fezes de aves infectadas. Dos patos os vírus foram transmitidos para galinhas, as quais posteriormente foram comercializadas nos mercados de Hong-Kong. Durante a transmissão entre diferentes espécies de aves os vírus agregaram a característica de serem altamente patogênicos para galinhas, sendo, eventualmente, transmitidos para humanos nos mercados de Hong-Kong (LAVANCHY, 1998; MATROSOVICH et al., 1999; HIROMOTO et al., 2000). Apesar do subtipo H5N1 ser altamente patogênico para galinhas e humanos, nada causa em patos e gansos os quais representam o reservatório natural do vírus (WEBSTER, 1998).

Através do seqüenciamento genético da cepa H1N1 em humanos entre os anos de 1986 e 1997 evidenciou-se que o Influenza A pode evoluir por dois ou mais caminhos evolutivos simultaneamente, confirmando a mutação média de quatro a seis nucleotídeos por ano (COX et al., 1989).

Estudos nos EUA com suínos entre os anos de 1976 a 1978 nos mostrou que o vírus da influenza suína acometeu 25% dos animais. Análises sorológicas nestes animais demonstram que o subtipo H1 continuam em alta circulação na América do Norte com média de 51%, do passo que o subtipo H3 antigenicamente similar ao H3 humano circulou com baixa frequência entre os anos de 1988 e 1989 com média de 1,1%. Surtos de influenza em suínos ocorridos na Europa em 1980 estão associados com o vírus influenza A, antigenicamente e geneticamente, distinguível dos variantes (H1N1) isolados em porcos na América do Norte (WEBSTER et al., 1992).

1.9 A patogenicidade do Influenza A (HPAI e LPAI)

Em aves domésticas os vírus do tipo A podem ser divididos em dois grupos de acordo com a capacidade de provocar doença e a gravidade dos sintomas que causam. Vírus da influenza altamente patogênicos para aves é denominado HPAI (sigla em inglês para highly pathogenic avian influenza) e os que causam apenas sintomas brandos são denominados 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 (ALEXANDRER, 2000).

Os subtipos H5 e H7 são únicos, até o presente momento, que podem ser de alta patogenicidade (HPAI) ao infectarem aves domésticas e causar surtos de gripe, embora nem todos os variantes sejam altamente patogênicos. Os outros subtipos de HA são considerados de baixa patogenicidade para aves (LPAI) e foram isolados de 105 espécies de aves, pertencentes a 26 famílias diferentes (BJÖRN, 2006).

Nas aves, os vírus de LPAI infectam preferencialmente as células do trato intestinal, e por isto excretam vírus em elevadas concentrações (ALEXANDER, 2000).

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

1.10 Epidemiologia

A vigilância epidemiológica é útil em prover informações a respeito da presença de vírus Influenza na comunidade, identificação dos tipos subtipos e cepas circulantes (BENFICA, 2005).

A evolução de variantes do Vírus da Influenza Aviária (AIV) capazes de apresentar caráter zoonótico é constante e tem sido demonstrada experimentalmente. As etiologias pelo menos das últimas duas pandemias (1918-1919 e 1968) foram caracterizadas como estirpes híbridas que continham genoma recombinante de AIV de aves e humanos. A ameaça de pandemia por AIV em humanos é uma preocupação permanente dos agentes de saúde pública, uma vez que há evidências dos vírus H5N1, H7N7, H7N3 e H9N2 terem sido transmitidos de aves para humanos nos mercados de aves de Hong Kong (HORIMOTO e KAWAOKA, 2001).

Diante da possibilidade de novas pandemias a OMS estabeleceu, em 1947, uma rede mundial de vigilância do vírus da influenza da qual somente nos Estados Unidos, a doença causa cerca de 110.000 hospitalizações com 36.000 mortes todos os anos (THOMPSON et al., 2003).

A diversidade genética do vírus e a existência da influenza em reservatório de anatídeos silvestre, qualificou-o como uma doença não erradicável do ponto de vista epidemiológico, sendo considerado desta forma uma constante ameaça à saúde pública. (WEBSTER, 1998).

A implementação da vigilância do vírus da influenza humana no Brasil, teve início em 1955, acarretando no monitoramento do vírus em diferentes estados brasileiros, contribuindo para o conhecimento das cepas virais circulantes em nosso território. Desde o ano de 2000, esse monitoramento vem auxiliando na composição da vacina a ser ministrada no hemisfério Sul (PAIVA, 2001).

Atualmente, os vírus do subtipo H5N1 são endêmicos da Ásia e encontraram um nicho ecológico em aves domésticas. Apesar de ser de difícil transmissão para seres humanos, sua exposição constante aos trabalhadores rurais e nos mercados asiáticos eleva a chance de ocorrer uma adaptação viral aos humanos e estes adquirirem a capacidade de transmissão eficiente de pessoa a pessoa. Por este motivo se faz necessário que seja realizado um monitoramento em aves silvestres e comerciais, afim de se 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). Por meio deste trabalho de monitoramento é possível formar painéis de cepas de referência que poderão ser utilizadas na fabricação de vacinas para eventuais surtos causados na população por vírus de origem aviária. Apesar de existir

programas de monitoramento contínuo de aves selvagens na Europa, Estados Unidos, Canadá, Japão e nos países asiáticos que possuem casos originados pelos vírus aviário H5N1, pouco foi feito no Brasil.

Apesar de cerca de 90 espécies de aves de 12 ordens diferentes serem portadoras de vírus da influenza ou suscetíveis a 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 e gansos (ALEXANDER, 2000).

Entre os anos de 2003 e 2006 a Organização Mundial de Saúde (OMS) registrou casos humanos de contaminação com o vírus H5N1 de origem aviária em 10 países, destes 6 Asiáticos, 2 africanos e 2 do oriente médio. Dos 238 casos registrados 139 vieram a óbito (WHO EPR, 2006).

Segundo a OIE entre os anos de 2003 e início de 2008, 61 cidades reportaram a detecção do subtipo H5N1 de HPAIV em aves silvestres e domésticas, colocando a OIE em estado de alerta, uma vez que, este vírus só havia sido descrito até então em aves de vida livre (OIE, 2008; SPARMAN, 2009).

Vírus da Influenza Aviária (AIV) foram isolados de água e de fezes da margem de lagos que abrigam comunidades de patos selvagens migratórios no Canadá. Este estudo concluiu que 20% destes animais estavam infectados, embora não apresentassem sinais clínicos. A baixa virulência em patos garante a preservação do vírus na natureza (MURPHY e WEBSTER, 1996).

Em 2002 no norte da China foi isolado de frangos o subtipo viral H7N2, com alta homologia para o vírus H7N1, isolado de aves silvestres provenientes da África, o que sugere a transmissão do vírus entre estas aves. A técnica utilizada para o isolamento viral foi a inoculação de amostras clínicas em ovos embrionados de 10 dias e a identificação foi realizada através do teste HI (LI et al., 2005). A baixa incidência de AIV nos períodos migratórios sub-tropicais das aves aquáticas pode explicar a baixa ou rara ocorrência da doença no Brasil (MURPHY e WEBSTER, 1996).

Foram registrados, 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)

Tendo em vista que um trabalho epidemiológico precisa ser desenvolvido no país, estratégias de estudo devem ser traçadas para obtenção de estudos sorológicos, pois desta forma poderemos conhecer a circulação destes vírus em nossos território.

1.11 Controle e prevenção

O controle ideal deve incluir prevenção da exposição, biossegurança, vigilância epidemiológica, diagnóstico, quarentena e educação (SWAYNE e SUAREZ, 2000). No Brasil, assim como em outros países signatários da OIE, a comunicação em caso da DNC é compulsória, e deve-se seguir uma série de ações profiláticas sanitárias, baseadas em amparo legal. O Decreto Nº 24.548 (1934) discorre sobre medidas de prevenção, controle e erradicação de doenças exóticas, incluindo o sacrifício de aves e a indenização dos proprietários. E a Instrução Normativa Nº32 (2002) da Secretaria de Defesa Agropecuária impõe: a notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial de sintomatologia suspeita, realização de investigação imediata por um médico veterinário oficial, imposição de restrição à movimentação de aves e seus produtos em casos suspeitos, estabelecimento por ato oficial de uma Zona de Proteção (num raio de 3 km do surto) e de Zona de Vigilância (num raio de 10 km do surto), controle da movimentação das pessoas na área de risco, o sacrifício de todas as aves e animais-contato do estabelecimento infectado, a limpeza e desinfecções constantes da área afetada e o descarte adequado dos resíduos, entre outras normas, seguindo o fluxograma abaixo:

Figura 6- Fluxograma de ações no caso de suspeita de Influenza A, Departamento de saúde animal (DSA). Fonte: de Thomazelli 2009.

1.12 DIAGNÓSTICO

Após a descoberta do agente causal da Influenza em 1933, houve um grande progresso no estudo da doença, devido às descobertas de que o vírus se multiplica em altos títulos em embriões de galinha e que podiam provocar hemaglutinação em eritrócitos de galinha. Descoberta ao acaso em 1941 por Hirst e McClelland, esta técnica forneceu um método simples de detecção e a inibição específica por anticorpos contra o vírus, possibilitou o desenvolvimento de uma prova altamente sensível de inibição da hemaglutinação (IH). O estudo da inibição da hemaglutinação desvendou o mecanismo de infecção das células hospedeiras, pois os receptores para os vírus nas hemácias foram comprovados como sendo os mesmos existentes na célula hospedeira suscetíveis (BENFICA, 2005).

O teste da hemaglutinação (HA) descrito por Hist 1942 posteriormente modificado por Salk (1944), o HA teste é extremamente sensível, apropriado para identificação de todos os subtipos da influenza, a desvantagem do teste consiste na remoção de receptores não específicos presentes nos soros dos animais a serem testados, no entanto este teste é recomendado e utilizado pela OMS para a vigilância global da influenza, motivo pelo qual nos levou a escolher esta técnica (KAWAMOTO, 1999)

O HA é uma técnica na qual, uma solução de hemácias é colocada em contato com uma suspensão de antígenos hemaglutinantes. Por ação da gravidade, as hemácias aglutinadas sedimentam em forma difusa, formando um manto, conhecido como rede e na ausência ou escassez do vírus, as hemácias sedimentam-se na forma de um botão compacto, no fundo do tubo ou da placa. A reação de hemaglutinação pode ser utilizada para detecção ou identificação preliminar de vírus isolados, pesquisando-se quais hemácias estes vírus aglutinam, e também pode ser aplicada para realizar a titulação de vírus hemaglutinantes, determinando-se a mais alta diluição de vírus que ainda é capaz de aglutinar hemácias (HIRST, 1941; KAWAMOTO, 1999).

O diagnóstico para o vírus da influenza é realizado seguindo quatro categorias: isolamento viral; detecção de proteínas virais; detecção dos ácidos nucleicos virais e do diagnóstico sorológico (COX, 1999).

As informações geradas através da vigilância epidemiológica e dos testes de diagnósticos servem como base para a tomada de decisão dos órgão competentes. A acurácia do diagnostico da gripe nas aves não pode basear-se apenas na sintomatologia dos animais pois há uma sobreposição dos sintomas pelo vírus da Influenza com outros patógenos. A sensibilidade e especificidade do diagnóstico baseado na definição de síndrome gripal variam de 63% a 78% e 55% a 71% respectivamente. A sensibilidade e o valor preditivo das definições podem variar, dependendo do grau de co-circulação com outros patógenos que acometem o trato respiratório (VAN ELDEN et al., 2001; SINTCHENKO et al., 2002; SMITH e ROBERTS, 2002).

Os testes diagnósticos disponíveis para avaliar a infecção do vírus da Influenza incluem o isolamento viral em culturas celulares, sorologia, pesquisa rápida de antígeno por técnicas enzimáticas, reação em cadeia pela polimerase (PCR) e imunofluorescência direta e indireta. A sensibilidade e especificidade de cada teste pode variar amplamente de laboratório para laboratório (STORCH, 2003).

A detecção direta de antígeno através de anticorpos monoclonais (IFD) constitui um diagnóstico confiável e relativamente rápido de apenas 2 a 4 horas, entretanto estudos de detecção dos vírus através esta metodologia mostram resultados extremamente variáveis (RAY e MINNICH, 1987; DOING et al., 1998).

As técnicas clássicas de diagnóstico laboratorial do vírus da Influenza consiste no isolamento viral e testes sorológicos.

O diagnóstico sorológico é realizado com base na demonstração do aumento de quatro vezes ou mais no título de anticorpos específicos, entre as amostras de soro das fases aguda e de convalescência, medidos através dos testes de inibição da hemaglutinação, ensaios imunoenzimáticos, fixação do complemento e testes de neutralização. Para o diagnóstico clínico, a sorologia não é muito recomendada pois há a necessidade de duas coletas da amostra uma no início das manifestações clínicas e a segunda coleta duas ou quatro semanas depois o que torna a técnica retrospectiva, no entanto a sorologia é bem aplicada em estudos epidemiológicos como ferramenta de pesquisa (COX e SUBBARAO, 1999).

O isolamento viral pode ser realizado em ovos embrionados e em cultura de célula primária de rim de macaco rhesus (PMK) ou em células de linhagem estabelecida de rim de cão, Madin-Darby canine kidney cell (MDCK), as quais são aceitas como “gold-standards” (GAVIN e THOMSON, 2003).

Devido a grande capacidade mutacional do vírus, o diagnóstico utilizando técnicas moleculares tornou-se um desafio. A reação em cadeia pela polimerase através da transcriptase reversa (RT-PCR) tem sido desenvolvida para a detecção e subtipagem dos vírus Influenza demonstrando um aumento na sensibilidade em comparação a outros testes rápidos e cultura celular convencional. A técnica de real-time RT-PCR, na qual a amplificação e detecção ocorrem no mesmo tubo de reação, provê resultados mais rápidos em relação à RT-PCR, com a vantagem adicional de reduzir problemas de contaminação (Taubenberger, 2001), porém as técnicas moleculares ainda apresentam um custo muito elevado em comparação com outros testes disponíveis.

Apesar da ampla disponibilidade de testes de diagnósticos rápidos, o isolamento viral através de técnicas clássicas continuam sendo fundamentais, pois um drift ou um shift antigênico, podem não ser detectados pelos primers já existentes. Os vírus isolados também são necessários para monitorar novos subtipos com potencial pandêmico.

6 CONCLUSÕES

- Verificamos a ausência total da circulação do vírus da Influenza A através da detecção de anticorpos utilizando o método da Inibição da Hemaglutinação (HI). Reforçando o status de que o Brasil é livre de Influenza aviária em patos domésticos da região amazônica;
- Desta forma não constatamos a ocorrência de anticorpos contra o vírus da Influenza A, em aves domésticas (patos, perus e frangos) residentes da região amazônica;
- Com os resultados obtidos podemos aferir que técnica esteja otimizada para a realização de futuros estudos soro epidemiológicos, para o vírus da influenza A em aves.

REFERÊNCIAS

AKAZAWA, M., SINDELAR J. L., PALTIEL, A. D. (2003). "Economic costs of influenza-related work absenteeism." *V. Health* 6(2): 107-115.

ALERSTAM, T. e A. HEDENSTROM. *The development of bird migration theory*. J. Avian Biol. 29: 343-69. (1998).

ALEXANDER, D. J. (2000). "A review of avian influenza in different bird species." *VET. Microbiol.* 74(1-2): 3-13

.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS. Relatório anual 2008/2009. disponível em : [HTTP://WWW.AVEWORD.COM.BR/IMG/FILE/RELATORIOS](http://www.aveword.com.br/img/file/relatorios).

BEGON, M., J. L. HARPER e C. R. TOWNSEND. *Ecology: Individuals, Populations and Communities*. 2º Ed. Blackwell Scientific Publications. (1990).

BENFICA, D.R. (2005). "investigação de metodologia laboratorial de detecção pelo vírus influenza". dissertação de mestrado apresentada à universidade federal de São Paulo – escola paulista de medicina.

BOERE, G.C.; STROUD, D.A. 2006. The flyway concept: what it is and what it isn't. waterbirds around the world. PP. 40-47.

BOLIAR, S., STANISLAWK, W., CHAMBERS, T.M., (2006); " Inability of kaolin treatment to remove nonspecific inhibitors from equine serum for the hemagglutination inhibition test against equine h7n7 influenza vírus". J.Vet.Diagn. Invest 18: 264- 267.

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.

BRIGGS, L. C., ASHTON, R. M., METCALF, P. (2003). "Development of a highly sensitive screen for influenza a in guano and its application in the search for ancient rna preserved under antarctic adolie penguin colonies." *Avian Dis.* 47(3): 1200-1202.

BROCKWELL-STAATS, C., WEBSTER, R.G., WEBBY, R.J.; (2009). "Diversity of influenza vírus in swine and the emergence of a novel human pandemic influenza a (H1N1)"; *Influenza And Other Respiratory Vírus*; (3): 207- 213.

BUSH, R. M., FITCH, W. M., BENDER, C. A., COX, N. J. (1999). "Positive Selection On The H3 Hemagglutinin Gene Of Human Influenza Vírus Wa." *Mol. Biol. Evol.* 16(11): 1457-1465.

CAPUA, I., ALEXANDER, D. J. (2004). "Avian Influenza: Recent Developments." *Avian Pathol.* (4): 393-404

.

CENTRO NACIONAL DE PESQUISA PARA CONSERVAÇÃO DAS AVES SILVESTRES (CEMAVE – IBAMA) Aves Migratórias Na Amazônia E A Gripe Aviaria. Informe 35/2006

.

CHAKRAVERTY, P , 1980. Comparison Of Haemagglutination Inhibition And Single Radial Haemolysis Techniques For Detection Of Antibodies To Influenza B Virus. *Archive Of Virology*, 63:285-289.

CHEN, G. W., YANG, C. C., TSAO, K. C., HUANG, C. G., LEE, L. A., YANG, W. Z., HUANG, Y. L., LIN, T. Y., SHIH, S. R. (2004). "Influenza A Vírus Pb1-F2 Gene In Recent Taiwanese Isolates." *Emerg. Infect. Dis.* 10(4): 630-636.

CLASS, E. C., OSTERHAUS, A. D., VAN, BEEK, R., DE JONG, J.C., RIMMELZWAAN, G. F., SENNE, D. A., KRAUSS, S., SHORTRIDGE, K. F. e WEBSTER, R. G. 1998, Human Influenza A H5n1 Virus Related To A Highly Pathogenic Avian Influenza Virus. *The Lancet* 351: 472-77

COOK, N.D. Una Primera Epidemia Americana De Viruela En 1493 ? *Revista De Indias*, 2003. vol LXIII, n° 227, pág: 49-64.

COX, N. J., BLACK, R.A., KENDAL, A.P., 1989; Pathways Of Evolution Of Influenza A (H1n1) Viruses From 1977 To 1986 As Determined By Oligonucleotide Mapping And Sequencing Studies. *Journal Of General Virology*; 70: 299-313.

COX, N.J., BENDER, C., 1995, The Molecular Epidemiology Of Influenza Viruses. *Semin. Virol.*6: 359-70.

COX, N.J., SUBBARAO, K. (1999). "Influenza". *The Lancet*; vol : 354 P.1277-82.

COX, N. J., SUBBARAO, K. (2000). "Global Epidemiology Of Influenza: Past And Present." *Annu. Rev. Med.* 51: 407-421.

CRESCENZO-CHAIGNE, B., NAFFAKH, N., WERF, S. (1999). "Comparative Analysis Of The Ability Of The Polymerase Complexes Of Influenza Viruses Type A, B And C To Assemble Into Functional Rnps That Allow Expression And Replication Of Heterotypic Model Rna Templates In Vivo." *Virology* 265(2): 342-353.

DAVISON S, BENSON CE, ZIEGLER AF, ECKROADE RJ. EVALuation Of Disinfectants With The Addition Of Antifreezing Compounds Against Nonpathogenic H7n2 Avian Influenza Virus. *Avian Diseases* 1999; 43: 533-537.

DESSELLBERGER, U., RACIANELLO, V. R., ZAZRA, J. J., PALESE, P. (1980). "The 3'- And 5'-Terminal Sequences Of Influenza A, B And C Viruses Are Higly Conserved And Show Partial Inverted Complementarity." *Gene* 8: 315-328.

VAN ELDEN, L.J.R., VAN ESSEN, G.A., BOUCHER C.A.B., NIJHUIS, M., SCHIPPER,P., VERHEIJ, T.M., HOEPELMAN,I.; (2001); " Clinical Diagnosis Of Influenza Vírus Infection: Evaluation Of Diagnostic Tools In General Practice"; J Gen Pract ;51: 630 -4.

EASTERDAY, B. C., HINSHAW, V. S. (1991). "Influenza I
Ed. Editores B.W. Calnek, H.J., Barnes, C. W. Beards L. R. Mcdougald Y. M. Saif,
Iowa State University Press, Ames, Iowa, Eua; P 533- 551.

EASTERDAY, B. C., HINSHAW, V. S., HALVORSON, D.A., (1997). "Influenza In:
Dieases Of Pou Ed. Editores B.W. Calnek, H.J., Barnes, C. W. Beards L. R.
Mcdougald Y. M. Saif, Iowa State University Press, Ames, Iowa, Eua; P 583- 605.

FERGUSON, N. M., GALVANI A. P., BUSH R. M. (2003). "Ecological And
Immunological Determinants Of Influenza Evolution." *Nature* 422(6930):428-33.

GAVIN, P. J., THOMSON, R.B.J., (2003), "Review Of Rapid Diagnostic Testes For
Influenza". Clin Applied Immunol. Rev 4: 151-72.

GERDIL, C. (2003). "The Annual Production Cycle For Influenza Vaccine." *Vaccine*
(21): 1776-1779.

HARRINGTON, B.A., ANTAS, P.T.Z., SILVA, F., (1986), "Northward Shorebird
Migration On The Atlantic Coast Of Southern Brasil." *Vida Silv Neot.* 1: 45-54.

HAY, A. J. (1998). "The Vírus 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, Gland.

HIROMOTO, Y., YAMAZAKI, Y., FUKUSHIMA, T., SAITO, T., LINDSTROM, S. E.
OMOE, K., NEROME, R., LIM, W., SUGITA, S., NEROME, K. (2000B). "Evolutionary
Characterization Of The Six Internal Genes Of H5n1 Human Influenza A Vírus." *J. Gen.
Virol.* 81(5): 1293-1303.

HIRST, G.K. 1941. Agglutination Of Red Cells By Allantoic Fluid Of Chick Embryos Infected With Influenza Vírus. *Science*, 94:22-23,1941

HOEHLING, A. A. The Great Epidemic. Boston: Little, Brown.1961.

HÖFLING, K., KLENK, H., HERRLER, G.; (1997); "Inactivation Of Inhibitors By The Receptor-Destroying Enzyme Of Influenza C Vírus"; *Journal Of General Virology*, 78: 567-570.

HORIMOTO T, KAWAOKA Y. Pandemic Threat Posed By Avian Influenza A Víruses. *Clinical Microbiology Review* 2001; 14: 129-149.

ITO T; SUZUKI Y; MITNAUL L; VINES A; KIDA H; KAWAOKA Y. Of Influenza A Receptor Specificity Víruses Correlates With The Agglutination Of Erythrocytes From Differents Animal Species. *Virology*, 227: 493-9,1997.

KATES, M., ALISON, A. C., TYRELL, D. A., JAMES, A. T. (1962). "Origen Of Lipids In Influenza Vírus." *Cold Spring Harbor Symp Quant. Biol.* 27: 293-301.

KAWAMOTO, A. H. N., MANCINI, D. A.P., PEREIRA, L.E., CIANCIARULLO, A.M., CRUZ, DIAS, A.L.F., MENDONÇA, R.M.Z., PINTO, J.R., DURIGON, E.L.. (2005). "Investigation Of Influenza In Migrating Birds, The Primordial Reservoir And Transmitters Of Influenza In Brasil"; *Brasilian Journal Of Microbiology*. 36: 88-93.

KAWAOKA, Y., KRAUSS, S., WEBSTER, R. G. (1989). "Avian-To-Human Transmission Of The Pb1 Gene Of Influenza A Víruses In The 1957 And 1968 Pandemics." *J. Virol.* 63(11): 4603-4608.

KLUMPP, K., RUIGROK, R. W., BAUDIN, F. (1997). "Roles Of The Influenza Vírus Polymerase And Nucleoprotein In Forming A Functional Rnp Structure." *Embo J.* 16(6): 1248-1257.

KNOSSOW, M., DANIELS, R. S., DOUGLAS, A. R., SKEHEL, J. J., WILEY, D. C. (1984). "Three-Dimensional Structure Of An Antigenic Mutant Of The Influenza Vírus Haemagglutinin." *Nature* 311(5987): 678-680.

KRAUSS, S., WALKER D., PRYOR, P.S., NILES, L., CHENGHONG, L., HINSHAW, V. S., WEBSTER, R.G." Influenza A viruses of migration wild aquatic birds in North America" *Vector-Born Zoon. Dis.*, 4 (3) : 177-189 (2004).

LAMB RA & KRUG RM. Orthomyxoviridae: The Víruses And Their Replication. In: Fields Virology, Ed. Bn, Fields Dm, Knipe Pm. Howley, 3^a Ed., Lippincott – Raven Publishers, Philadelphia, 1996. p. 1353-1395.

LAMB, R. A., CHOPPIN, P. W. (1983). "The Gene Structure And Replication Of Influenza Vírus." *Ann. Rev. Biochem.* 52: 467-506.

LAVER, W.G., WEBSTER, R. G. (1973)." Studies On The Origin Of Pandemic Influenza. 3 Evidences Implicating Duck And Equine Influenza Víruses As Possible Progenitors Of The Hong Kong Strain Of Human Influenza." *Virology* 51: 383-391.

LAVANCHY, D. (1998). "The Who Update On Influenza A (H5n1) In Hong Kong." *Euro Surveill.* 3(3): 23-25.

LAVER, W. G., WEBSTER, R. G. (1973). "Studies On The Origin Of Pandemic Influenza. 3. Evidence Implicating Duck And Equine Influenza Víruses As Possible Progenitors Of The Hong Kong Strain Of Human Influenza." *Virology* 51(2): 383-391.

LI, K. S., GUAN, Y., WANG, J., SMITH, G. J., XU, K. M., DUAN, L., RAHARDJO, A. P., PUTHAVATHANA, P., BURANATHAI, C., NGUYEN, T. D., ESTOEPANGESTIE, A. T., CHAISINGH, A., AUEWARAKUL, P., LONG, H. T., HANH, N. T., WEBBY, R. J., POON, L. L., CHEN, H., SHORTRIDGE, K. F., YUEN, K. Y., WEBSTER, R. G., PEIRIS, J. S. (2004). "Genesis Of A Highly Pathogenic And Potentially Pandemic H5n1 Influenza Vírus In Eastern Asia." *Nature* 430(6996): 209-213.

LI, Y., LI, C., LIU, L., WANG, H., WANG, C., TIAN, G., WEBSTER, R.G., YU, K., CHEN,H., (2006);" Characterization Of An Avian Influenza Vírus Of Subtype H7n2 Isolated From Chickens In Northern China". *Vírus Genes*; 33: 117-122.

LIN, J., ANDREASEN, V., LEVIN, S. A. (1999). "Dynamics Of Influenza A Drift: The Linear Three-Strain Model." *Math. Biosci.* 162(1-2): 33-51.

MARTINS N.R.S. (2001). "Influenza Aviária: Uma Revisão Dos Últimos Dez Anos." *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 3(2): 97-140.

MATROSOVICH M, ZHOU N, YOSHIHIRO K, WEBSTER R. "The Surface Glycoproteins Of H5 Influenza Vírus Isolated From Humans, Chickens, And Wild Aquatic Birds Have Distinguishable Properties". *Journal Of Virology* 1999; 73: 1146-1155.

MCGEOCH, D., FELLNER, P., NEWTON, C. (1976). "Influenza Vírus Genome Consists Of Eight Distinct Rna Species." *Proc. Natl. Acad. Sci. Usa* 73: 3045-3049.

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 Vírus." *J. Biol. Chem.* 275(12): 8592-8599.

MURPHY BR, WEBSTER RG. "Orthomyxovíruses. In: Fields Virology, Editores B.N. Fields, Dm Knipe, Pm Howley, Lippincott" – Raven Publishers, Philadelphia, 1996. p. 1397-1445.

NAKAJIMA, S., NOBUSAWA, E., NAKAJIMA, K. (2000). "Variation In Response Among Individuals To Antigenic Sites On The Ha Protein Of Human Influenza Vírus May Be Responsible For The Emergence Of Drift Strains In The Human Population." *Virology* 274: 220-231.

NETO T.J. (2001) " A História Da Gripe- A Influenza Em Todos Os Tempos E Agora" Ed Dezembro Editorial 120P.

NEUMANN, G., WATANABE, T., KAWAOKA, Y. (2000A). "Plasmid-Driven Formation Of Influenza Vírus-Like Particles." *J. Virol.* 74(1): 547-551.

NGUYEN-VAN-TAM, J.S., HAMPSON, A.W., (2003); " The Epidemiology And Clinical Impact Of Pandemic Influenza". Vaccine; 21: 1762- 1768.

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.

PARK, E. K., CASTRUCCI, M. R., PORTNER, A., KAWAOKA, Y. (1998). "The M2 Ectodomain Is Important For Its Incorporation Into Influenza A Virions." *J. Virol.* 72(3): 2449-2455.

PEREIRA, L.E., SUZUKI, A., SOUZA, DE P.R., SOUZA, G.C.F.M., FLAUTO, G. (1998); "Sazonalidade Das Populações De *Vídeo Olivaceos* (Linnaeus, 1766), (Aves Vireonidade) Em Regiões Da Mata Atlântica Do Estado De São Paulo." Ararajuba, 6: 117- 22.

POSS PE, HALVORSON DA, KARUNAKARAN D. "Economic Impact Of Avian Influenza In Domestic Fowl In The United States. Proc 1st "International Symposium Avian Influenza 1981, Carter Comp. Corp., Richmond, Usa, 1982. P. 100-111.

RAY, C.G., MINNICH, L.L.; (1987);" Efficient Of Immunofluorescence For Rapid Detection Of Common Respiratory Vírus"; J Clin Microbiol, 25(2): 355- 7.

SMITH, K., ROBERTS, M.S.:(2002); "Cost- Effectiveness Of Newer Treatment Atrategies For Influenza"; Amer J Med, 113: 300 -07.

SICK, H. (1997); "Ornitologia Brasileira" Rio De Janeiro; Ed. Nova Fronteira.

SICK, H. (2001). "Composição Da Avifauna Brasileira" P. 129-135. In Pacheco, J. F. (Ed.), Ornitologia Brasileira. Nova Fronteira, Rio De Janeiro, Brasil.

SIMONSEN, L., CLARCK, M.J., SCHONBERGER, L.B., ARDEN, N.H., COX, N.J. e FUKUDA, K.; (1998); "Pandemic Versus Epidemic Influenza Mortality: A Pattern Of Changing Age Distribution"; J Infect Dis, 178: 53-60.

SPACKMAN, E., (2009); "The Ecology Of Avian Influenza Virus In Wild Birds: What Does This Mean For Poultry?"; Poultry Science; 88: 847 – 850.

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.

STORCH, G.A.; (2003); " Rapid Diagnostic Tests For Influenza"; Curr Opin Pediatr; 15: 77 – 84.

SUBBARAO, K., KLIMOV, A., KATZ, J., REGNER, H., LIM, W., HALL, H., PERDUE, M., SWAYNE, D., BENDER, C., HUANG, J., HEMPHILL, M., ROWE, T., SHAW, M., XU, X., FUKUDA, K., COX, N. (1998). "Characterization Of An Avian Influenza A (H5n1) Virus Isolated From A Child With A Fatal Respiratory Illness." *Science* 279(5349): 393-396.

SUZUKI IT, SUZUKI T, TAKADA A, HORIMOTO T, WELLS K, KIDA H, OTSUKI K, KISO M, ISHIDA H, KAWAOKA Y. "Recognition Of N-Glycneuraminic Acid Linked To Galactose By The Alpha2,3 Linkage Is Associated With Intestina Replication Of Influenza A Virus In Ducks". Journal Of Virology 2000; 74: 9300-9305.

TALAVERA, G.A., (1999) "Influenza: Historia De Uma Enfermedad". Rev Biomed, 10: 57 – 61.

TAUBENBERGER, J.K., REID, A.H., KRAFFT, A.E., ET AL; (1997); " Initial Genetic Characterization Of The 1918 Spanish Influenza Virus"; Science; 275: 1793- 6.

TAUBENBERGER, J.K., REID, A. H., JANCZEWSKI, T. A., FANNING, T. G. Integrating Historical Clinical And Molecular Genetic Data In Order To Explain The Origin And Virulence Of The 1918 Spanish Influenza Virus. *Phil Trans R Soc Lond B*, 2001, 356,1829-1839;

THOMAZELLI L.M. (2004) "Vigilância Epidemiológica De Vírus Respiratório Humano Em Amostras Clínicas Pela Técnica De Genescan-Rt-Pcr." Dissertação de Mestrado.

THOMAZELLI, L.M. (2009) "Vigilância Epidemiológica Do Vírus Da Doença De Newcastle Em Aves Domésticas E Selvagens Pelo Método De Real Time Pcr"; Tese De Doutorado.

TRABULSI L.R. E ALTERTHUM F. (2005) " Microbiologia" Ed Atheneu Rio De Janeiro Brasil.

VENTURINI KS, SARCINELLI MF, DA SILVA LC. 2007; " Características Da Carne De Frango." Boletim Técnico - Pie-Ufes:01307. Universidade Federal Do Espírito Santo – Ufes. Pró-Reitoria De Extensão - Programa Institucional De Extensão.

WEBBY, R.J. E WEBSTER, R.G. (2003) "Are We Ready For Pandemic Influenza?" *Science* 302: 1519-1522.

WEBSTER R. G. (1998). "Influenza: An Emerging Disease." *Emerg. Infect. Dis.* 4(3): 436-441.

WEBSTER R.G., PEIRIS M., CHEN H., GUAN Y. (2006). "H5N1 Outbreaks And Enzootic Influenza." *Emerg. Infect. Dis.* 12(1): 3-8.

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.

WEI HUA, WEI H. "The Present Status Of The Poultry Industry In Guangdong Province". *Poultry Husbandry And Disease Control* 1998; 10: 8.

WHO (14/08/2006). "Cumulative Number Of Confirmed Human Cases Of Avian Influenza A/(H5n1)." *Epidemic And Pandemic Alert And Response (Epr)*.

WHO, FACT SHEET 211, 1999.

WHO (2009). " INFLUENZA A (H1N1): Who Announces Pandemic Alert Phase 6, Of Moderate Severity".

WILEY DC, SKEHEL JJ. Viral Membranes. In: *Virology*, ED. B.N. FIELDS, D.M. KNIPE, P.M. HOWLEY, 2^a ED., RAVEN PRESS, NEW YORK, 1990. P. 63-85.

WOOD, J. M.; GAINES-DIAS, J.; TAYLOR, J. & CHAKRAVERTY, P ., 1994. Comparison Of Influenza Serological Techniques By International Collaborative Study. *Vaccine*, 12:167-174.

YAMASHITA, M., KRYSTAL, M., PALESE, P. (1989). "Comparison Of Three Large Polymerase Proteins Of Influenza A, B, And C Viruses." *Virology* 171: 458-466.

ZAMBON, M. C. (1999). "Epidemiology And Pathogenesis Of Influenza." *J. Antimicrob. Chemother.* 44(B): 3-9.

ZEBEDEE, S. L., LAMB, R. A. (1988). "Influenza Virus M2 Protein: Monoclonal Antibody Restriction Of Virus Growth And Detection Of M2 In Virions." *J. Virol.* 62: 2762-2772.