

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE INFLUENZA A
SUBTIPO H1, NA AVICULTURA FAMILIAR DA
REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS
E SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL**

Rui Pitágoras de Lima Castro Filho

Belo Horizonte, 2017

**DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DE INFLUENZA A
SUBTIPO H1, NA AVICULTURA FAMILIAR DA
REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS
E SANTA MARIA, RIO GRANDE DO SUL**

Rui Pitágoras de Lima Castro Filho

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, como
requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal.

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva

Prof. Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte, 2017

C355d Castro Filho, Rui Pitágoras de Lima, 1985-
Diagnóstico sorológico de influenza A subtipo H1, na avicultura familiar da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais e Santa Maria, Rio Grande do Sul / Rui Pitágoras de Lima Castro Filho. – 2017.
44 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Ave doméstica – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Vírus da influenza – Teses.
3. Gripe aviária – Diagnóstico – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

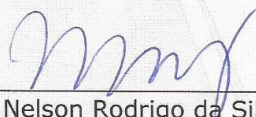
CDD – 636.508 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

RUI PITÁGORAS DE LIMA CASTRO FILHO

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 14 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



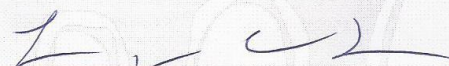
Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Presidente - Orientador



Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG



Dr. Daniel Ambrózio da Rocha Vilela
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente - IBAMA



Prof. Leonardo José Camargos Lara
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer todo apoio, amor, carinho e estrutura que minha família forneceu durante toda a minha vida. Eu jamais teria conseguido chegar a lugar algum sem eles. À minha mamãezinha, Ana Linda Princesa, deixo meu coração. Ao meu pai, José Portino Herói, deixo minha razão. E ao meu querido irmão, Paulo Santos, especial, sempre tão fragilizado e indefeso, que lutou com muita dificuldade para desenvolver seu corpo e mente, ofereço e dedico a você essa vitória, esse diploma, esse título. Minhas queridas tias e tios, primas e primos, eu vos amo MUITO, Aos meus grandes amigos da vida, do esquadrão e do acaso, um brinde e uma picanha. Querida Semente do Mal, obrigado por aturar todos os momentos de estresse e me apoiar durante toda essa etapa. Essa vitória também é sua. Vou respeitosamente me balançar no candelabro. Obrigado.

Ao pessoal de apoio, limpeza, técnicos, porteiros, guardas, vigilantes, nenhuma instituição de ensino e pesquisa funcionaria sem vocês.

Aos colegas do setor, Hannah, Mayara, Natália, Lilian, Xtela, Aila, Ana e Bruna, obrigado pela paciência.

Professor José Sérgio Resende e Professora Sandra Yuliet Marin, agradeço toda ajuda e constantes contribuições ao setor.

Gostaria de agradecer as oportunidades que me foram concedidas pelo Professor Leonardo José Camargos Lara, por ter acreditado em mim durante a graduação, obtive um aprendizado pessoal e profissional inestimável.

Ao Professor Nelson Rodrigo da Silva Martins que sempre foi mais que um orientador, foi um guru, um amigo, um verdadeiro educador. Um exemplo a ser seguido, uma meta, um ídolo. Obrigado.

E por fim, devo imensa gratidão à Escola de Veterinária da UFMG, CAPES, FAPEMIG e CNPQ. Juntos, trabalhando por um futuro melhor, investindo na maior ferramenta do Homem, o conhecimento.

SUMÁRIO

RESUMO	7
1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo Geral.....	10
2.2 Objetivos específicos.....	10
3. REVISÃO DE LITERATURA	11
3.1 Histórico	11
3.2 Etiologia	11
3.3 Agente Etiológico.....	12
3.4 Resistência do vírus.....	13
3.5 Epidemiologia	14
3.6 Variabilidade Viral.....	16
3.7 Sinais clínicos e lesões	17
3.8 Diagnóstico	19
3.9 Isolamento e identificação viral	20
3.10 Diagnóstico diferencial.....	20
3.11 Tratamento.....	21
3.12 Prevenção e controle.....	22
3.13 Profilaxia.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Coleta de material	24
4.2 Cultivo de vírus.....	25
4.3 Hemaglutinação	25
4.4 Produção de soro controle positivo	26
4.5 Produção de antígeno para imunodifusão	26
4.6 Imunodifusão em géis ágar (IDGA)	27
4.7 Inibição da hemaglutinação (IH).....	28
5. RESULTADOS	29
6. DISCUSSÃO	31

7. CONCLUSÕES	34
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Subtipos do gênero influenza.....	13
Tabela 2 - Locais de coleta de amostras na região metropolitana de Belo Horizonte/MG.....	24
Tabela 3 - Locais de coleta de amostras na região metropolitana de Santa Maria/RS	25
Tabela 4: Local de coleta com número de amostras e resultados dos exames de imunodifusão em géis ágar e inibição da hemaglutinação na macroregião de Belo Horizonte/MG.....	30
Tabela 5: Inibição da hemaglutinação para anticorpos contra o subtipo H1 das amostras da região central de Belo Horizonte (MC5, MC7 e MC13), de Lagoa Santa (LG4 e LG15), da cidade administrativa de Belo Horizonte (P4), e de Ribeirão das Neves (RB13 e RB21) em Minas Gerais.	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Surtos de Influenza aviária de alta patogenicidade no período de 2014 a 2016. (OIE – Disease outbreak maps. Jan 2014-Dez 2016).....	15
Figura 2 - Principais rotas de aves migratórias (Olsen, 2006).	16
Figura 3 - Reação positiva entre o controle e o antígeno. (Consiste no encontro dos anticorpos da amostra sorológica e antígenos, que geram precipitação em formação de linha opaca no local. A ausência da linha indica resultado negativo).....	27

RESUMO

Foram analisadas 704 amostras de soros de aves das espécies *Gallus gallus domesticus* e *Cairina moschata* (Anatidae) de diferentes idades e sexos, para teste sorológico de influenza A por imunodifusão em gel de ágar e inibição da hemaglutinação. As amostras de soros de galináceos foram obtidas em propriedades de produção familiar em 20 municípios diferentes nas regiões do entorno de Santa Maria/RS e Metropolitana de Belo Horizonte/MG e as amostras de soros de anatídeos incluíram amostras de aves de vida livre e domésticas. Os testes utilizados foram recomendados pela Organização Mundial de Saúde Animal, incluindo a imunodifusão em gel de ágar (IDGA) para anticorpos contra a nucleoproteína (N) de influenza A e a inibição da hemaglutinação (IH) para anticorpos contra a hemaglutina do subtipo H1. Dentre as 704 amostras de soro avaliadas por IDGA, foram encontradas oito (n=8) reagentes (8/704; 1,13%) para N, sendo seis (6/704; 0,85%) destes soros re-testados por IH, positivos para anticorpos específicos para o subtipo H1, incluindo soros de cinco galinhas e um pato. Duas amostras (2/701; 0,25%) de soros (*G. gallus domesticus*) reagentes por IDGA não foram confirmadas no IH para anticorpos contra H1, sugerindo especificidade para outro subtipo. Os resultados indicaram baixa ocorrência de aves com anticorpos para o vírus da influenza A, sendo os reagentes predominantemente específicos para o subtipo H1, embora tenham sido detectados anticorpos para subtipo não identificado e com uma ave anatídea reagente. Os resultados sugerem baixa prevalência de anticorpos para influenza A em aves da avicultura não intensificada nas duas regiões avaliadas e possivelmente baixa atividade viral no período estudado.

Palavras-Chave: Influenza A, Brasil, diagnóstico sorológico, *Gallus gallus domesticus*, avicultura familiar.

ABSTRACT

Serum samples (n=704) were collected from *Gallus gallus domesticus* and *Cairina moschata* (Anatidae) for the investigation of antibodies to influenza A virus. Samples were collected from birds of family poultry of the surrounding counties of Santa Maria/RS and the metropolitan region of Belo Horizonte/MG totaling twenty different counties and seventeen ducks including free-living and domestic birds. The chosen tests for the survey were agar gel immunodiffusion (AGID) for antibodies to influenza A virus nucleoprotein (N) and haemagglutination inhibition (HI) for the H1 subtype, with protocols as described by the World Organisation for Animal Health (OIE). Out of the 704 tests performed by AGID, eight (8/704) were revealed positive for antibodies to N (1.13%), with six (6/704) of these retested positive (0.85%) by HI for H1 subtype specific antibodies. Two samples tested positive by AGID were shown to be not reactive in the H1 subtype specific HI, suggesting responses to other subtype. A low occurrence of antibodies to influenza A was found and most were specific to subtype H1, although 0.25% were specific to an unknown subtype. One anatid bird was shown reagent in both tests. The low occurrence of antibodies may suggest a low activity of influenza A virus during the period of study.

Keywords: Influenza A, Brazil, serological diagnosis, *Gallus gallus domesticus*, family poultry.

1. INTRODUÇÃO

A influenza aviária é uma enfermidade exótica para a avicultura comercial Brasileira, o que está em conformidade com as normas sanitárias internacionais, sendo inclusive proibida a vacinação em aves (MAPA, 2013), de notificação e erradicação obrigatória, representa grande fonte de renda para o país, emprega milhares de trabalhadores e confere ao Brasil uma posição de destaque internacional como o maior exportador de carne de frango do mundo. Populações avícolas comerciais de subsistência possuem hospedeiros assintomáticos e a interação entre humano e animal são próximas e menos tecnificadas, temos então um aumento dos fatores de risco quanto a disseminação do vírus como zoonose, que consequentemente representa um grave perigo à saúde pública, à avicultura industrial, aos animais da criação familiar e à economia. Os critérios para definição de focos de risco são a concentração de Anseriformes silvestres e ou domésticos na proximidade de áreas úmidas (alagadiças), com concentração de população humana e com criação de aves. (Brasil, 2005). Este estudo objetiva a amostragem de criações de subsistência, onde os fatores de risco de um surto de influenza são consideravelmente maiores devido às características dos sistemas de produção de subsistência e familiar, associados às medidas de biossegurança muitas vezes não empregadas num contexto ecológico potencialmente vulnerável.

O vírus da influenza aviária possui mecanismos evolutivos que permitem sua perpetuação e disseminação na natureza, tais como a resistência na água, principalmente em regiões frias (Stallknecht *et al.*, 2006). As aves migratórias aquáticas têm infecção assintomática, com replicação viral predominantemente no trato digestório e a transmissão oro-fecal (horizontal), conferindo status de reservatório natural a estas aves e transmissão na água dos lagos ou praias habitados por elas. Na epidemiologia da doença, estão incluídas diversas ordens de mamíferos, incluindo os seres humanos como hospedeiros susceptíveis (Sanhong *et al.*, 2015). Suas características biológicas conferem variabilidade genética ao vírus, como o processo natural de mutação constante, ou o surgimento de novas estirpes recombinantes viáveis resultantes da troca de segmentos homólogos por células co-infectadas com vírus de constituições diferentes (Jong *et al.*, 2000).

Do ponto de vista epidemiológico, as epidemias e pandemias de influenza estão associadas às modificações na estrutura da sociedade humana, com a expansão da atividade humana que favorece a seleção de novas estirpes virais, que associadas a contextos ecológicos, sociais e espaciais, podem rapidamente precipitar epidemia em múltiplas espécies de hospedeiros. De acordo com os boletins da vigilância da OIE, as regiões mais acometidas por surtos são América do Norte, Noroeste Africano, Europa e Ásia (OIE, 2017)

As estirpes H5 e H7, de notificação e erradicação obrigatórias, podem causar doença grave em aves *Gallus gallus domesticus* (Swayne *et al.*, 2008). Como as rotas migratórias interligam todo o Globo terrestre, de maneira que nenhuma região está completamente segura ou ausente de riscos. Os sistemas de vigilância e notificação em âmbito nacional e internacional são hoje, a maneira mais eficaz de entender a dinâmica e epidemiologia da doença e sua força de propagação, com a possibilidade de antecipar ou até mesmo prevenir um surto. Neste contexto, para melhor avaliação do status epidemiológico, os sistemas de criação de subsistência devem ser monitorados. A metodologia de triagem escolhida será imunodifusão em gel de ágar e inibição da hemaglutinação por ser, na proposição da triagem da avicultura familiar, uma técnica mais facilmente adotável pelos laboratórios, e prescritos pela OIE para comércio internacional.

Tendo em vista o impacto sócio-econômico e os riscos reais de um surto de escala industrial no Brasil, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) criou um Grupo executivo interministerial para implantação do Plano Brasileiro de preparação para uma pandemia de Influenza (Brasil, 2010), que

consiste no Plano de prevenção à Influenza aviária em aves silvestres e de subsistência, cujo objetivo geral é propor, mediante articulação técnica sanitária, ambiental e zoossanitária, ações a serem empreendidas em áreas de risco, prevendo estratégias de detecção precoce e atuações no sentido de minimizar a possibilidade de ocorrência do vírus da influenza aviária de alta patogenicidade no território Nacional. As definições operacionais relativas à vigilância epidemiológica e zoossanitária em áreas de risco deverão ser periodicamente atualizadas pelo MAPA e Ministério da saúde (MS), na medida em que ocorram mudanças no cenário epidemiológico internacional ou nacional ou que surjam novas evidências científicas sobre as medidas propostas.

Resultados preliminares do estudo de cenários pandêmicos de influenza no Brasil, utilizando-se um modelo Asiático, indicam um impacto negativo importante na demanda aos serviços de saúde humana. Usando-se como modelo taxas de ataque entre 20 a 33% num período de 5 a 8 semanas, significaria a ocorrência de 37 milhões a 61 milhões de casos. Estimando-se 13% da população como pertencente ao grupo de maior risco para as complicações da doença e que, destes, 30% venham a requerer alguma intervenção médica, teríamos 5 milhões de casos complicados entre indivíduos de alto risco. Dentre os doentes que não pertencem a nenhum grupo do risco, esperam-se 13 milhões de casos complicados, o que totalizaria 18 milhões de pessoas requerendo atendimento para complicações em todo o Brasil. O que se pode obter, a partir de modelos matemáticos, é identificar um pequeno conjunto de estratégias eficazes que cubram diversos cenários possíveis, junto com alguns indicadores que ajudem na identificação de qual cenário está sendo considerado. Em resumo, dadas as várias incertezas que permeiam uma pandemia de influenza, nenhum modelo pode ser considerado completamente preditivo e nenhum método de controle pode ser identificado como ótimo (Brasil, 2010).

Sendo assim, na medida em que os surtos ocorrem nas mais diversas regiões do planeta, cresce também a demanda por maiores estudos, bem como a necessidade de constante vigilância. O Brasil é um país geograficamente privilegiado, o clima e a irradiação solar colaboram para não perpetuação do vírus no ambiente, além disso possui menor interação de rotas migratórias em seu território. Portanto, os fatores ambientais e a excelência dos sistemas de produção de aves industriais, têm permitido a manutenção de status de área livre na produção industrial.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de anticorpos para influenzavirus A e subtipo H1 na avicultura de subsistência/familiar em da região metropolitana de Belo Horizonte e Santa Maria.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar plantéis de avicultura familiar na região metropolitana de Belo Horizonte (MG) e Santa Maria (RS).

Pesquisar anticorpos específicos para a nucleoproteína do vírus da influenza aviária por imunodifusão em gel de ágar.

Pesquisar anticorpos específicos para a hemaglutinina H1 por inibição da hemaglutinação.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Histórico

A Influenza Aviária foi descrita pela primeira vez na Itália em 1878, pelo pesquisador Perroncito, que a diferenciou das doenças bacterianas. Em 1901 Centanni & Savunozzi atribuíram a causa da doença a um agente filtrável (vírus) (Moraes, *et al.*, 2009). A Gripe Espanhola, ocorrida no período de 1918-1920, tornou-se, até o momento, o parâmetro moderno de pandemia de influenza devido a sua rápida disseminação e incomparável virulência (Morens *et al.*, 2010), resultando na morte de mais de 50 milhões de pessoas em todo o mundo. Em 1924 surgiu nos Estados Unidos, atingindo frangos, mas a erradicação ocorreu rapidamente, em um só ano. Em fins de 1983, novamente, a doença apareceu nesse país, sendo erradicada a um custo de aproximadamente 50 milhões de dólares (Santos *et al.*, 2009). Em 1961 foi descrito um foco de vírus HPAI em aves selvagens no sul da África (H5N3), que, entretanto, teve pouco impacto nas aves silvestres e desapareceu rapidamente (Becker, 1966).

A doença foi assinalada em praticamente todo o mundo, mas os focos dos vírus de Influenza Aviária de alta patogenicidade eram considerados de rara ocorrência. A partir de 1996, no entanto, iniciou-se uma série de epidemias com vírus H5 e H7, as quais se manifestaram em alguns países de todos os continentes: Hong Kong (1997, 2001, 2002, 2003), Austrália (1997), Chile (2002), América Central (2000, 2001, 2003), Holanda, Bélgica e Alemanha (2003), Canadá (2004), EUA (2004), África do Sul (2004), Sudeste Asiático (2004, 2005), Ásia e Europa (2005, 2006) (Mounts *et al.*, 1999; Capua & Alexander, 2002; Tran Tinh Hien *et al.*, 2004; Donalísio, 2006; Yee *et al.*, 2009).

A epidemia com o vírus H5N1 iniciada no fim de 2003 no Sudeste Asiático (ainda em ação) envolveu até 2007 mais de 150 milhões de aves (OPAS, 2005b; MAPA, 2007). Além do Vietnã, Tailândia, Camboja, Laos e Indonésia a doença foi identificada na Coreia, Japão, China, Rússia, Casaquistão e Mongólia (Ibiapina *et al.*, 2005). Em outubro de 2005 o vírus entrou na Europa, via Turquia, se espalhando pelo resto do continente, principalmente em aves selvagens (Yee *et al.*, 2009).

No Brasil, até o momento não foram relatados casos clínicos da doença, bem como o diagnóstico laboratorial. O MAPA possui laboratório de referência em Campinas/SP e realiza esforços de prevenção da doença, inclusive com a parceria de empresas públicas e privadas.

3.2 Etiologia

Influenza aviária, doença infecciosa de origem viral causada pelo Orthomyxovirus tipo A, altamente contagioso. Enfermidade de notificação obrigatória frente a Organização Mundial da Saúde Animal (OIE). Afeta o aparelho respiratório, entérico e nervoso (Bailey, 2004, OMS, 2014)

Segundo a OIE IA está definida como uma “Doença infecciosa de etiologia viral altamente contagiosa. É causada pelos vírus da influenza aviária (AIV), integrante da família *Orthomyxoviridae*, do gênero *Influenza A*, de patogenicidade intravenosa maior que 1,2 (aves SPF de seis semanas); ou causada por AIV dos subtipos H5 ou H7; ou, ainda, por estirpes cuja glicoproteína da fusão (em HA2) presente o

sítio de clivagem com sequências de múltiplos aminoácidos básicos, de notificação e erradicação obrigatórias, classificada no grupo de doenças da OIE” (Martins, 2001; Alexander, 2005).

As aves aquáticas como as gaivotas e aves migratórias de varias espécies são tidas como reservatórios naturais, nesses animais, o vírus replica no intestino sem produzir sinais clínicos (Suarez, 2000; Flores, 2007; Henaux *et al.*, 2013). O padrão de migração dessas aves pode ter efeito na distribuição global do vírus IA (Hurt *et al.*, 2014)

A Influenza Aviária (IA) é conhecida como gripe aviaria, gripe do frango, resfriado das aves, peste aviaria (Rojo, 2008).

3.3 Agente Etiológico

O agente etiológico da influenza aviaria é um vírus RNA de fita simples constituído de oito segmentos, esférico ou pleomórfico com, aproximadamente, 200nm de diâmetro. Pertencente ao gênero *Influenzavirus* da família *Orthomyxoviridae*. O vírus é envelopado com projeções glicoprotéicas de hemaglutinina (H) e neuraminidase (N) fundamentais para a ligação com as células e a imunidade (Hinshaw *et al.*, 1982). Internamente está presente um núcleo capsídeo (RNA + proteína) helicoidal contendo 8 segmentos de RNA que codifica por 10 tipos de proteínas (Alexander, 2008). Os H e N podem diferir antigenicamente dando lugar à variante fenotípica viral. Nas aves estão presentes todas aquelas conhecidas: 18 para H e 11 para N, os quais, combinando-se, determinam um grande número de subtipos, denominadas cada um com a sigla H(n) N(n) (Alexander, 2005; Alexander 2008; Martins, 2012, Tong, 2013).

Esta característica depende da estrutura viral e pode variar temporalmente devido a mutações ou recombinações genéticas fazendo com que cepas pouco patogênicas possam se transformar em cepas altamente patogênicas (Alexander, 2008; Tong *et al.*, 2012).

Tabela 1. Subtipos do gênero influenza

Gênero	Espécie	Subtipos	Hospedeiros
Influenzavirus A	Influenza A virus	H1N1, H1N2, H3N1, H3N2, H5N1, H5N2, H5N3, H5N8, H5N9, H7N1, H7N2, H7N3, H7N4, H7N7, H9N2, H10N7	Homem, suínos, aves e cavalos
Influenzavirus B	Influenza B virus		Homem e focas
Influenzavirus C	Influenza C virus		Homem e porcos
Isavirus	Infectious salmon anemia virus	Batken vírus Dhori vírus	Salmão
Thogotovirus	Thogoto vírus Dhori vírus		Carrapato, mosquito, mamíferos (incluindo o Homem)

3.4 Resistência do vírus

O vírus é resistente a baixas temperaturas e nessas condições permanece ativo nas fezes (7 a 30 dias a 0°C), tecidos e água. Pode sobreviver na água contaminada por secreções e fezes de aves aquáticas (reservatórios do vírus), mas quando as aves migram sua permanência na água é pouco duradoura (OIE, 2015).

O vírus pode ser destruído a 60°C em 30 minutos, fervura por 2 minutos, luz solar direta por 1 a 2 dias e é inativado rapidamente por raios UV e pH extremos. A infectividade também é rapidamente destruída pela formalina, agentes oxidantes, ácidos diluídos, éter, íons amônia, entre outros desinfetantes usados na avicultura (Alexander, 2000; Moraes *et al.*, 2009).

Os vírus de influenza aviária são muito estáveis no líquido alantóide, em função das proteínas presentes no ovo que o protegem. Para que a infectividade do vírus seja mantida por um longo período, o vírus precisa ser armazenado a -70°C ou então ser liofilizado. Existe uma dificuldade para eliminar o vírus em casos de surto nos quais o vírus esteja protegido por material orgânico, secreção nasal, ocular e fezes, porque a matéria orgânica não permite a ação dos desinfetantes ou detergentes e protege o vírus da destruição. Nos galpões a melhor maneira de eliminar o vírus, é fazer a retirada de toda a matéria orgânica presente no aviário, a limpeza com detergente neutro, desinfecção com vários desinfetantes combinados, o uso de lança chamas e o vazio sanitário (Alexander, 2000).

3.5 Epidemiologia

O Vírus da IA tem distribuição mundial causa infecções agudas ou assintomáticas em varias espécies de aves como patos, gaivotas, galinhas, codornas, faisões e perus, também pode infectar mamíferos como suínos, equinos, chimpanzés e humanos. Contudo, para que ocorra infecção nas aves domésticas é necessário que essas entrem em contato com o vírus. A transmissão entre diferentes espécies de aves se dá por contato direto ou indireto das aves domésticas com aves reservatórios naturais por exposição direta com as fezes ou com água ou terra contaminada com as fezes. As aves e as pessoas se infectam por via oral ou aérea do vírus presente nas fezes e secreções (OIE, 2015).

Assim, o contato com as aves silvestres é determinante para a ocorrência de surtos de influenza na avicultura comercial (Brentano *et al.*, 2006).

As aves aquáticas podem atuar como reservatórios silenciosos, excretando altas quantidades de vírus de alta patogenicidade, mesmo mostrando pouco ou nenhum dos sinais da doença (Alexander, 2005). Algumas espécies de aves migratórias podem propagar o vírus H5N1 para regiões da Ásia Central e Europa (Yee *et al.*, 2009). Aves que sobrevivem à infecção podem excretar o vírus até por 10 dias através de aerossóis, saliva, secreções nasais e fecais, o que facilita a propagação (Brentano, 2005; Alexander, 2008). Nas aves silvestres e aquáticas, tais como patos, a excreção viral foi detectada por até mais de 30 dias após a infecção. Elas também parecem sofrer ciclos periódicos de reinfeção por diferentes subtipos de vírus (Easterday *et al.*, 1997 citado por Brentano, 2005). Por isso, é de grande importância o conhecimento sobre as espécies aviárias que se apresentam como reservatórios silenciosos e como hospedeiros susceptíveis, para um melhor entendimento da dinâmica da infecção pelo vírus de Influenza A. Por isso o monitoramento das aves migratórias é necessário e de grande importância para evitar a entrada do vírus no Brasil (Nunes *et al.*, 2006).

O vírus está presente no intestino de aves infectadas onde persiste de modo inaparente (LPAI). Muitas destas aves são migratórias e transportam o vírus para todas as regiões do mundo (Nunes *et al.*, 2006). Durante as paradas em propriedades de zonas úmidas encontram outras espécies de aves migratórias ou domésticas e com isso é criada uma situação ideal para o contágio interespecífico, devido ao fato de grande parte dessas aves ser composta por indivíduos jovens mais suscetíveis. Outros grupos como pombos, andorinhas e pardais parecem pouco suscetíveis. As corujas são sensíveis, mas, não são reservatórios importantes da doença (Stallknecht, 2007). As aves domésticas são consideradas elos que fazem a ligação entre aves selvagens e outros animais como, por exemplo, o suíno. Todas as aves domésticas são sensíveis, como galinhas poedeiras, frangos, pavões e, principalmente, os perus (MAPA, 2007).

Entre as espécies domésticas, os suínos têm um papel fundamental na transmissão do vírus, pois, podem ser infectados pelos vírus da influenza aviária e da influenza humana, bem como pelos da influenza suína. Quando vírus de espécies diferentes infectam os suínos, podem se recombinar e novos vírus emergem, numa mistura dos vírus de influenza suína, humana e/ou aviária (Brown, 2004). Neste momento, existem quatro principais subtipos dos vírus de influenza A que foram isolados nos suínos: H1N1, H1N2, H3N2 e H3N1, sendo que muitos dos vírus recentemente isolados dos suínos têm sido o H1N1. O suíno funcionaria como hospedeiro intermediário importante para a transmissão do vírus de aves a humanos (Brown, 2004; Ibiapina *et al.*, 2005; Silvia 2006).

Nos felídeos o primeiro caso de infecção foi notificado em dezembro de 2003 em dois tigres e dois leopardos em um zoológico da Tailândia, que morreram por terem comido carcaças inteiras de frangos frescos infectados. E em outubro de 2004 houve outra epidemia em um segundo zoológico tailandês, com morte de 147 tigres entre os 441 que lá viviam. Através desses casos poderemos concluir que nas carcaças de frangos ingeridos estava presente uma razoável carga viral. Investigações subsequentes mostraram que houve transmissão do vírus entre tigres (OPAS, 2006).

Diversos países europeus detectaram H5N1 em aves migratórias provenientes do continente asiático, mas há grande discussão na comunidade científica acerca de outras formas de transmissão entre os países, como: a exportação de aves vivas, gaiolas contaminadas, rações contaminadas, trânsito de pessoas entre outros (OPAS, 2007; Yee *et al.*, 2009). Em um boletim da World Health Information Database de janeiro de 2014 a dezembro de 2016, a influenza aviária de alta patogenicidade foi identificada em 77 países com 13 estirpes diferentes, e é responsável pela morte de centenas de milhares de aves domésticas e silvestres (OIE, 2017) e causando prejuízos inestimáveis à economia.

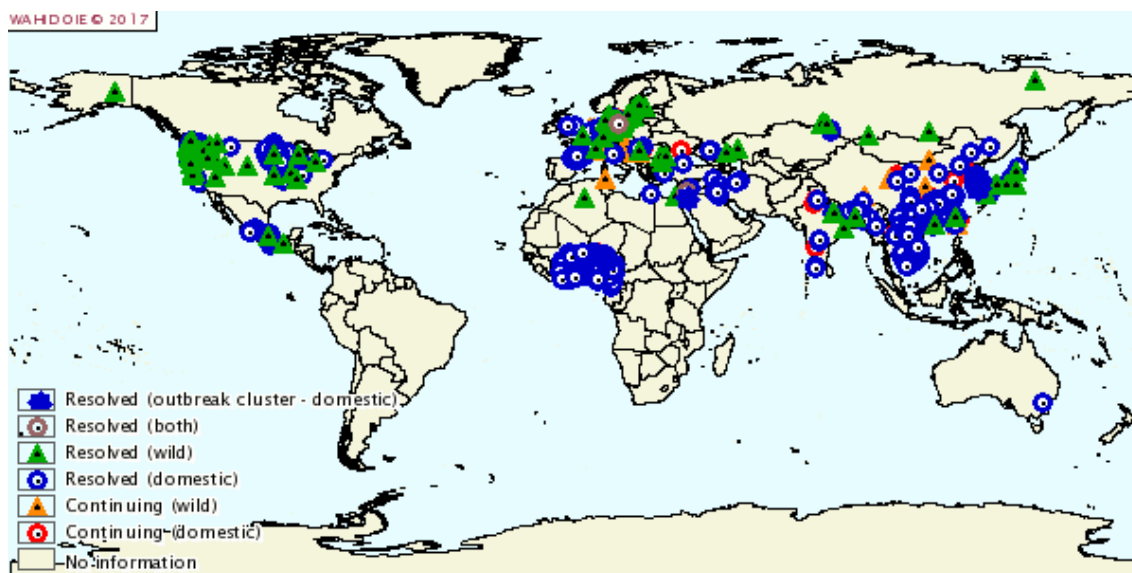


Figura 1: Surtos de Influenza aviária de alta patogenicidade no período de 2014 a 2016. (OIE – Disease outbreak maps. Jan 2014-Dez 2016). (OIE, 2017).

No Brasil, as rotas de aves migratórias são seguidas por aves provenientes do Canadá, da costa leste americana e do Alasca, como na ilustração a seguir:

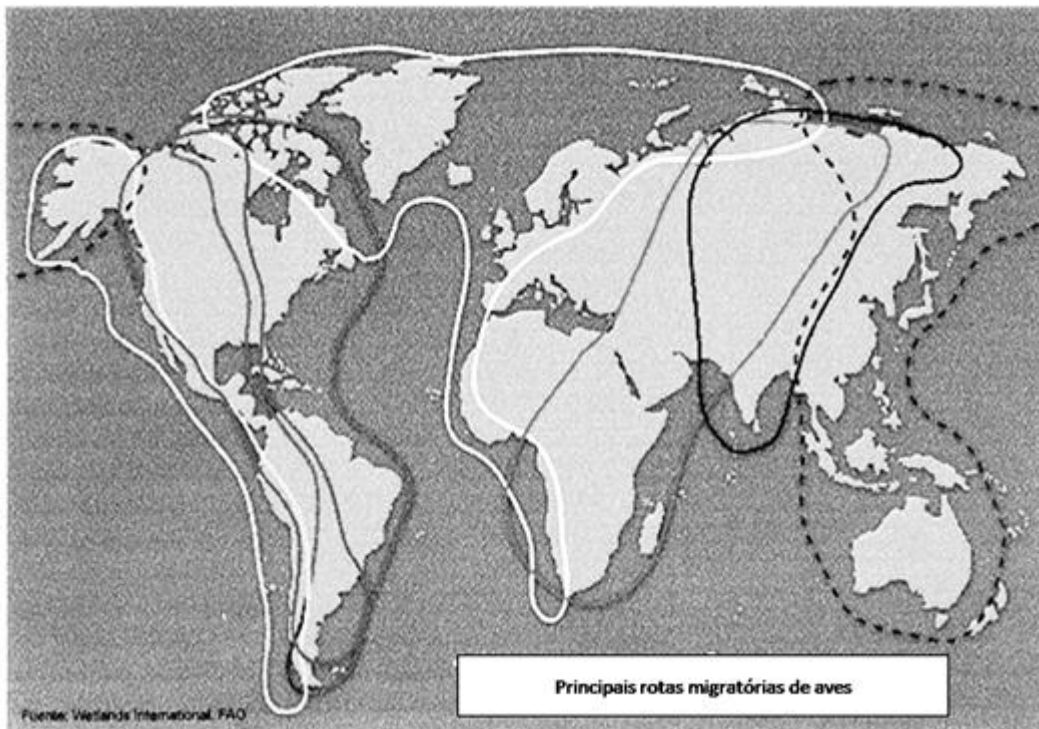


Figura 2. Principais rotas de aves migratórias (Olsen, 2006).

Por essa razão a vigilância de embarcações, o controle de tráfego de animais e de importações, legais ou ilegais, é fundamental (Yee *et al.*, 2009). Outra via de entrada de H5N1 em nosso meio poderá ser causada pelos viajantes internacionais provenientes de áreas de risco para gripe aviária. Até o momento, os poucos casos suspeitos de gripe aviária em humanos foram descartadas (Ibiapina *et al.*, 2005).

Os hábitos culturais do Oriente, condições ambientais, geografia e manejo de convivência entre mamíferos, aves e o homem, podem explicar a origem das pandemias e de gripe aviária na Ásia (Martins, 2001). O convívio próximo entre animais, como as aves e os suínos e a espécie humana favorecem a circulação de diferentes vírus originários de animais e humanos ao mesmo tempo (Vranjac, 2006). A extensa produção de aves em ambiente doméstico, a circulação de aves domésticas e aquáticas, e de humanos em mercados, a falta de higiene e controle sanitário na criação e no abate das aves, possibilita a disseminação dessa doença (Alexander, 2000; Vramjac, 2006).

Podemos concluir que a rápida disseminação entre aves ocorre pela grande quantidade de vírus nas fezes destes animais (Hinshaw *et al.*, 1982), que podem contaminar o ambiente através de aerossóis e disseminar o vírus para locais mais distantes, pelo transporte de objetos contaminados como solado de calçados, gaiolas, equipamentos, caixas, etc. Tudo isso pode explicar a disseminação da doença em criações domésticas de pequenos vilarejos na Ásia (Alexander, 2000; Martins, 2001).

3.6 Variabilidade Viral

Como todos os vírus RNA, o vírus aviário possui uma elevada taxa de mutação que ocorre segundo dois mecanismos.

1. Desvio Antigênico (*Drift*)
2. Substituição Antigênica (*Shift*) ou recombinação

No primeiro caso, *drift*, trata-se de acumulações de mutações de ponto do RNA, que podem substituir os aminoácidos codificados (não sinonímia), neste caso podendo determinar mudanças na sequência protéica e no aspecto antigênico. A somatória das mutações em um sítio antigênico determina periodicamente o aparecimento de novas estirpes do mesmo subtipo ou novos subtipos (a taxa média de mutação dos genes da hemaglutinina é aproximadamente mil vezes superior da síntese normal das células dos mamíferos) (Spackman *et al.*, 2005).

No segundo caso, *Shift*, ocorre a substituição completa do gene que codifica uma proteína viral, como por exemplo, a hemaglutinina ou neuraminidase. Isto é possível pelo fato de o genoma ser segmentado, formado por oito segmentos independentes de RNA, que podem ser trocados com outro vírus quando replicam juntos em uma mesma célula, resultando na formação de verdadeiros híbridos virais (Ibiapina *et al.*, 2005; Capua *et al.*, 2006). Estes últimos podem exibir novas combinações de H e N de origem heteróloga juntamente com as proteínas externas e internas (Spackman *et al.*, 2005). As recombinações se verificam normalmente em indivíduos de espécies receptivas à infecção por diferentes subtipos ao mesmo tempo, como os suínos, diversas espécies de aves e os cães (Zhu *et al.*, 2015).

A infecção de humanos ou de suínos por vírus influenza aviários e influenza humanos, no mesmo período de tempo, pode gerar novos vírus com potencial pandêmico, decorrentes da recombinação genética entre esses subtipos virais (Vramjac, 2006). Esses novos vírus podem expressar antígenos de superfície para os quais a população humana não apresenta imunidade (OMS, 2004; Ibiapina *et al.*, 2005). Para superar o processo seletivo eles devem adaptar-se ao novo hospedeiro e ter capacidade de transmissão. Isto requer numerosos ciclos virais e, por isso, numerosas passagens de hospedeiro a hospedeiro (Spackman *et al.*, 2005).

A propagação, no entanto, não é necessariamente acompanhada de alteração na patogenicidade, que depende tanto do vírus quanto do hospedeiro e dos alvos celulares envolvidos. Como exemplo, o vírus H5N1/Hong Kong/97 é resultado da recombinação ocorrida em gansos, patos e codornas (H5N1+H6N1+H9N2=H5N1), sendo altamente patogênico, e apesar de ser particularmente agressivo pela mutação de uma proteína interna (NS1), até hoje não é encontrado no homem, isto é, não está em grau de replicar-se eficientemente nem de retransmitir-se (Ellis *et al.*, 2004; Olsen *et al.*, 2006). Esta

propriedade, porém, poderia ser adquirida de um híbrido H5N1 com o vírus de influenza humano (Ibiapina *et al.*, 2005, Martins, 2012).

3.7 Sinais clínicos e lesões

Ocorrem duas formas clínicas principais da doença:

- Influenza Aviária de baixa patogenicidade (LPAI)
- Influenza Aviária de alta patogenicidade (HPAI)

Essas duas formas podem coexistir, dependendo da estirpe viral, bem como da susceptibilidade do hospedeiro. Por isso o mesmo vírus pode ocasionar formas diversas em espécies diferentes. A morbidade é sempre elevada e frequentemente a doença apresenta alta morbidade e baixa mortalidade (Moraes *et al.*, 2009).

A influenza aviária de baixa patogenicidade é considerada a forma benigna. Nas aves selvagens é a forma prevalente e os sintomas, geralmente, passam despercebidos (portadores com sintomas leves). Nas espécies domésticas o quadro clínico é muito variável, dependendo da espécie, podendo ocorrer infecções concomitantes ou secundárias, geralmente como consequência de alterações dos sistemas respiratórios, digestório, nervoso e reprodutivo, havendo diminuição do consumo de alimento, depressão, emagrecimento, conjuntivite, corrimento nasal, sinusite, lacrimejamento, edema da face e cabeça, cianose, alterações nervosas e diarreias. Ocorre ainda diminuição nos parâmetros produtivos, como ganho de peso e produção de ovos. Em geral, a menos que ocorram complicações bacterianas, a cura ocorre após 7 a 10 dias. Os sintomas são mais evidentes e mais intensos nos perus (Martins, 2001; Alexander, 2008).

A Influenza Aviária de alta patogenicidade é a forma maligna da peste aviária clássica. Até o momento em todas descritas foram isolados os sorotipos H5 e H7. Nas aves selvagens é muito raro e o primeiro caso foi descrito em 1961, no Sul da África, onde 1300 aves selvagens foram encontradas mortas, nas quais foi isolado o subtipo H5N3 (Becker 1966). Em 2005 foram descritos casos letais nos países asiáticos envolvidos em uma epidemia de H5N1, onde ocorreu a morte de cerca de 6000 pássaros de diversas espécies (Spackman, 2005; OPAS, 2007).

Os sinais clínicos na HPAI variam desde depressão, redução de apetite, interrupção de postura, ovos deformados e sem casca, inchaço e coloração azulada da barbela e cristas, tosse, espirros, diarreias,

sintomas nervosos, tremores e paresias. O desenvolvimento da doença pode acontecer em poucos dias, com alta mortalidade, que chega a 100% dos mais susceptíveis, ocorrendo neles, muitas vezes, a forma hiperaguda (morte súbita) (Martins, 2001; Moraes *et al.*, 2009).

As lesões anatomopatológicas nas duas formas são mais ou menos evidentes segundo o desenvolvimento da doença e as lesões não são patognomônicas e elas poderão estar ausentes nos casos de morte súbita (Martins, 2012). As lesões macroscópicas se caracterizam por aparecimento de congestões, hemorragias, transudato e lesões necróticas nos pulmões, sacos aéreos, fígado, rins, e ovário. Quando as lesões ocorrerem na forma HPAI são mais extensas e severas (Moraes *et al.*, 2009). A pele pode apresentar pequenos focos necróticos se estendendo na crista e barbelas. As lesões nos vasos sanguíneos são evidenciadas através dos edemas, hemorragias e congestão. São consideradas lesões clássicas na HPAI: edema e cianose de cabeça, alterações na crista, edema nas patas, petéquias na gordura abdominal e superficialmente nas mucosas e serosas, bem como necrose e hemorragias na mucosa da moela e do proventrículo (Alexander, 2008; Moraes *et al.*, 2009). As lesões microscópicas são pouco importantes para o diagnóstico.

3.8 Diagnóstico

Em humanos é difícil diferenciar a gripe aviária de uma gripe complicada com pneumonia.

A história clínica e os sintomas podem levar a um diagnóstico somente presuntivo da doença, porque os sintomas podem ser confundidos facilmente com outras doenças. A confirmação da doença deve ser feita pelo isolamento e identificação do agente para caracterização do subtipo e determinação do seu grau de patogenicidade ou detecção e caracterização do RNA em tecidos infectados ou secreções (Stallknecht *et al.*, 2007). No Brasil, o isolamento e identificação do vírus de IA só é feito por laboratórios credenciados pelo MAPA e devem atender rígidas normas de biossegurança e qualidade. O laboratório de referência para a identificação de AIV no Brasil é o Lanagro – em Campinas SP (Martins, 2001; Moraes *et al.*, 2009). Este laboratório é equipado com sistema adequado de biossegurança nível 3 e, portanto, com condições de fazer o diagnóstico e a tipificação das amostras virais que venham a ser isoladas, sendo o único autorizado e reconhecido oficialmente para o diagnóstico de doença de Newcastle e Influenza Aviária no Brasil (Brentano, 2005). O monitoramento sorológico é importante para detectar anticorpos contra a IA, que servem para ajudar no diagnóstico precoce da doença em aves silvestres, migratórias ou de fundo de quintal, e detectar casos subclínicos da doença. Testes sorológicos confirmam exposição viral ao vírus, mas, não o estado atual da doença (Stallknecht *et al.*, 2007).

3.9 Isolamento e identificação viral

Os tecidos recomendados para amostragem refletem o quadro clínico ou sistemas mais comumente atingidos pela infecção, principalmente sistema respiratório, digestório e nervoso (Martins, 2012). O vírus da influenza tem sido isolado de amostras individuais ou um conjunto de amostras de tecidos. Para o isolamento viral podem ser coletados, em aves mortas ou sacrificadas: pulmão, traquéia, sacos aéreos, intestinos, cérebro, fígado, baço e coração. Estes tecidos devem ser conservados em gelo e enviados o mais rápido possível para o laboratório de diagnóstico. Em caso de suspeita de Influenza Aviária os veterinários credenciados pelo MAPA são os responsáveis pela coleta e envio de amostras para o laboratório. Nas aves vivas, os suabes de cloaca, traquéia e fenda palatina são utilizados com frequência, principalmente, na investigação do vírus em aves migratórias ou silvestres.

Embriões de galinhas SPF (livres de patógenos específicos) podem ser inoculados entre 9 e 11 dias de incubação via cavidade alantóide com material suspeito (macerado de tecidos ou excreções) tratado com antibióticos e antimicóticos e inoculados via cavidade alantóidea. Os ovos inoculados são incubados e avaliados diariamente por ovoscopia durante sete dias para determinar morte embrionária. Os líquidos alantóides (LA) dos embriões vivos, mortos ou com alterações de desenvolvimento em até sete dias após a inoculação, são examinados para atividade hemaglutinante (vírus frente a hemácias). Os LAs com atividade hemaglutinante são examinados para a caracterização do agente em testes para a identificação de influenza A em reação contra anticorpos específicos para a nucleoproteína (imunodifusão em gel de ágar – IDGA), de inibição da hemaglutinação com anticorpos policlonais ou monoclonais específicos contra cada subtipo de influenza A e para diferencial do vírus da doença de Newcastle (VDN) (Alexander 2005; Moraes *et al.*, 2009, Martins, 2012).

3.10 Diagnóstico diferencial

A IA causa nas aves sintomas respiratórios que variam em intensidade, queda na produção e qualidade dos ovos, sintomas digestivos e nervosos, os quais devem ser diferenciados de outras doenças que acometem as aves entre elas doença de Newcastle, clamidiose, micoplasmose, coriza infecciosa, bronquite, pneumovirose, laringotraqueite, enterite viral dos patos, cólera aviária, entre outras. Doenças imunodepressoras concomitantes dificultam o diagnóstico da influenza aviária (Moraes *et al.*, 2009).

3.11 Tratamento

Evidentemente em aves não se recomenda o tratamento e sim o sacrifício humanitário de todas as aves e eliminação das carcaças utilizando práticas sanitárias (Stallknecht *et al.*, 2007). Nos seres humanos a abordagem é totalmente diferente. Devemos observar algumas considerações: é necessário, para contenção de uma pandemia, estoques de medicamentos para tratamento. A OMS possui estoque para até 3 semanas de início da pandemia. Deve-se tratar todos os casos, além dos contatos com isolamento total da área. É importante que sejam tratados os grupos prioritários que são os pacientes hospitalizados, profissionais da área da saúde, gestantes, doentes crônicos e idosos. Para que o tratamento seja eficaz, deve-se tratar o mais precocemente possível.

Estão disponíveis para o tratamento da infecção pelo vírus da IA, quatro medicamentos de duas diferentes classes:

- Os *Inibidores da neuraminidase*. Há dois medicamentos desta classe aprovados para utilização a partir de um ano de idade: oseltamivir (Tamiflu ®1999) e zanamivir. Estes medicamentos atuam sobre uma das duas principais estruturas de superfície do vírus da influenza, a proteína neuraminidase. Para apresentarem eficácia, devem ser administrados o mais rápido possível, no máximo, 48 horas do início dos sintomas (Hayden *et al.*, 2004; OPAS, 2005b; Donalísio, 2006).
- *Inibidores M2*. Há também dois medicamentos nesta classe, disponíveis há mais tempo: amantadina (Symetrel ®1966) e rimantadina (Flumadine ®1993), para o tratamento e quimioprofilaxia, usados em adultos e crianças com um ano de idade ou mais (Martins, 2001; OPAS, 2005b; Donalísio, 2009).

As principais dificuldades no tratamento da Influenza Aviária estão relacionadas à capacidade limitada de produção dos medicamentos e ao preço muito elevado, tornando-os inacessíveis para muitos países. Além disso, para terem efeito, a doença, nos humanos, precisa ser diagnosticada precocemente (Donalísio, 2006). No surto de 1997, o uso de tratamento foi pouco eficiente para prevenir as mortes das pessoas infectadas. Seis dos sete pacientes que usaram corticóide faleceram, assim como 80% dos pacientes que usaram Oseltamivir. Alguns pacientes necessitaram de ventilação mecânica, especialmente nos dois primeiros dias da doença. O tratamento de suporte parece ser o único tratamento aceitável (Ibiapina *et al.*, 2005).

3.12 Prevenção e controle

Segundo as recomendações da OIE, a utilização de vacinas para o controle da gripe aviária apresentaria vantagens e desvantagens (Moraes *et al.*, 2009). Como desvantagens está a permanência do vírus no ambiente; o descuido na biossegurança por parte do produtor, por sentir-se seguro na presença da vacina, já que na presença de animais vacinados o vírus poderia facilitar o surgimento de novas variantes virais pela pressão de seleção; a vacina poderia favorecer o surgimento de portadores assintomáticos, aumentando a disseminação viral. Como vantagens, pode-se destacar: a vacina pode prevenir a doença na ocorrência de surtos; poderia minimizar a possibilidade de transmissão do vírus para os humanos; e ainda auxilia na erradicação do vírus em determinada área quando todos os indivíduos tornam-se negativos (Moraes *et al.*, 2009).

No controle da IA o mais importante é a implementação de medidas de biossegurança, já que a vacinação tem características particulares em cada país. A decisão de vacinar ou não deve estar associada a análises das vantagens e desvantagens, além do surgimento de novas tecnologias na produção de vacinas, para tornar sua aplicação mais segura (Moraes *et al.*, 2009).

A vacinação como prevenção necessita de estudos e pesquisa por parte dos especialistas. Além disso, restrições comerciais são impostas quando da utilização de vacinação, afetando a importação de produtos da indústria avícola.

3.13 Profilaxia

Para a prevenção da gripe aviária medidas rígidas de biossegurança devem ser implementadas:

- Deve-se evitar o contato das aves domésticas com as aves selvagens, principalmente aves aquáticas e migratórias como marrecos, patos, gansos, perus e pássaros silvestres (Moraes *et al.*, 2009).
- Evitar a entrada em criadouros de aves que estejam em situação sanitária desconhecida.
- Deve-se controlar nos casos suspeitos o deslocamento de pessoas nas áreas de risco. Evitar o trânsito de pessoas e animais.
- Utilizar os métodos adequados de limpeza e desinfecção do criadouro, incluindo gaiolas, veículos e fômites em geral, remover a sujeira, esterco e outras matérias orgânicas das superfícies, lavar, aplicar desinfetantes e uso de vassoura de fogo.

- Devido a diferentes níveis de susceptibilidade, recomenda-se a criação de aves de idade única (Martins, 2001).
- Nos focos confirmados, recomenda-se o sacrifício de todas as aves, incluindo as que não apresentam sintomas. Elas devem ser descartadas em local adequado, impedindo a contaminação de fontes de água e lençóis freáticos, além de impedir o consumo por outros animais.
- Trabalhadores das granjas devem tomar banho e trocar de roupa ao entrar e ao sair do trabalho.
- Nas granjas de produção de aves, não criar suínos ou outros animais mamíferos junto com as aves.
- Fornecer aos visitantes roupas e calçados limpos, próprios das granjas.
- Desinfecção de veículos ao entrar e sair da granja.
- Usar equipamento exclusivo da granja, não transferir equipamentos entre granjas.
- Não possuir aves silvestres ou de fundo de quintal em granjas avícolas e nem na residência dos trabalhadores.
- Não visitar mercado com aves vivas.
- Lavar as mãos cuidadosamente antes e depois de entrar em contato com as aves.
- Evitar viajar para locais em que exista surto da doença. Se não for possível, tomar medidas de limpeza e higiene pessoal e evitar visitar granjas avícolas por um período não inferior a 21 dias (Lourenço, 2006).

O vírus da IA faz parte das doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Qualquer suspeita da doença deve ser notificada comunicada ao MAPA, para que o Ministério tome as medidas de controle necessárias para evitar a difusão da doença com medidas como isolamento e quarentena (Moraes *et al.*, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de ética no uso de animais – UFMG (CEUA) pelo protocolo 175/ 2016.

4.1 Coleta de material

Foram coletadas 704 amostras de sangue de aves de subsistência da região metropolitana de Belo Horizonte (MG) e Santa Maria (RS) no período de julho a novembro de 2016, para a separação de soro.

As amostras foram obtidas de 21 locais diferentes, 11 em Belo Horizonte, e 10 em Santa Maria totalizando 512 amostras na região metropolitana de Belo Horizonte e 192 na macroregião de Santa Maria. Todas as amostras de aves *Gallus gallus domesticus* foram coletadas em criações de fundo de quintal.

Todas as amostras de aves *Cairina moschata* foram coletadas no laboratório de rotina de doenças das aves da Escola de veterinária da UFMG, de aves de vida livre do entorno da Cidade Administrativa de Minas Gerais, chegadas ao laboratório para análise.

O material coletado, 3 ml por animal, foi acondicionado em tubos individuais, sem anticoagulantes e transportados em caixas térmicas com gelo a 0°C até o local de estocagem permanente, freezer -20 °C.

Tabela 2 – Locais de coleta de amostras na região metropolitana de Belo Horizonte/MG

Grande Belo Horizonte/MG	(n) Amostras	<i>Gallus gallus</i>	<i>Cairina moschatta</i>
Cidade Administrativa	5		5
Rotina (enviados ao laboratório)	39	27	12
Sabará	20	20	
Ribeirão das Neves	32	32	
Pedro Leopoldo	32	32	
Confins	32	32	
Lagoa Santa	32	32	
Região Central Belo Horizonte	64	64	
Betim	32	32	
Contagem	32	32	
Periferia Belo Horizonte	192	192	
Total	512	495	17

Tabela 3 – Locais de coleta de amostras na região metropolitana de Santa Maria/RS

Macroregião Santa Maria/RS	(n) Amostras	<i>Gallus gallus</i>	<i>Cairina moschata</i>
Pains	22	22	
São Valentim	17	17	
Santo Antônio	19	19	
Arroio Grande	20	20	
Santa Flora	18	18	
Tere	11	11	
Passo do Verde	15	15	
Arroio do Só	1	1	
Palmas	11	11	
Boca do Monte	58	58	
Total	192	192	0

4.2 Cultivo de vírus

O isolado de influenza A PR8: Strain A/ Puerto Rico/ 8/ 1934 H1N1 de influenza A, mantido a -20 °C em líquido cório-alantóide, foi diluído a 10^{-3} e tratado em solução contendo penicilina (2.000 UI/mL), gentamicina (0,50 g/mL) e micostatina (1000 UI/mL). 0,1 ml da solução foi inoculada na cavidade alantóide de ovos SPF embrionados com 9 a 11 dias (OIE, 2009). Os ovos foram incubados a 37°C / 60% umidade relativa (IP70D, Premium Ecológica, Belo Horizonte, Brasil) durante até 7 dias. O líquido cório-alantóide de cada ovo ao final dos sete dias, durante o processo de incubação, foi coletado após eutanásia dos embriões, submetidos à temperatura de 7°C em geladeira “overnight” e testados para presença de atividade hemaglutinante pelo método de hemaglutinação em placa. Havendo atividade hemaglutinante, realizou-se a titulação do antígeno e obtivemos o resultado de 1/512.

4.3 Hemaglutinação

A metodologia utilizada está publicada no capítulo 2.3.4 do manual terrestre da OIE (2012). Foram utilizadas placas de microtitulação em fundo “V” ou “U”, onde o volume final foi de 0,050 mL (50 µL).

Os reagentes utilizados foram PBS (0,015 M), pH 7.2-7.4, e suspensão de hemácias. O sangue foi retirado de 3 galinhas SPF, em partes iguais com citrato de sódio (anticoagulante). O sangue foi

centrifugado 3 vezes a 1.000 rpm por 8 minutos e lavado em PBS em todas as etapas. Então diluímos as hemácias 100 vezes e obtemos uma suspensão de 1%.

Para o teste de hemaglutinação levamos 0,025 mL de PBS em cada poço da placa de microtitulação, adicionamos 0,025 mL da amostra do vírus suspenso em líquido cório-alantóide na titulação de 1/512 na primeira coluna dos poços. Para descobrir o título da amostra, serão feitas diluições seriadas 1/2, 1/4, 1/8 sucessivamente. Realizamos retrotitulação de 0,025 mL em linha, do primeiro poço até o último (12), em todos os poços, misturando oito vezes com micropipeta regulada para 0,025 mL. Adicionamos então 0,025 mL de solução de hemácias a 1% em todos os poços. Mantivemos a placa em repouso à temperatura ambiente por 40 minutos para avaliação do teste.

Os poços que apresentarem depósito de hemácias não contém título suficiente para hemaglutinação, sendo considerados negativos. Os poços com título viral mantém as hemácias em suspensão, não formando botão ao fundo.

4.4 Produção de soro controle positivo

Para obtenção de soro de controle positivo, com anticorpos específicos para AIV, foram utilizadas 3 aves *Gallus gallus domesticus* de origem SPF, duas fêmeas e um macho onde todos receberam o mesmo protocolo de inoculação. O inóculo consistiu de emulsão oleosa em adjuvante completo de Freund (SIGMA, Estados Unidos) na proporção de 1:1 com o vírus de referência PR8: Strain A/ Puerto Rico/ 8/ 1934 H1N1 de influenza A titulado em 512 unidades hemaglutinantes. O vírus foi inativado com formalina 0,1% previamente à emulsificação, conforme a recomendação do manual terrestre 2.3.4 da OIE 2012. A inoculação ocorreu por via intramuscular na musculatura peitoral das aves. Após 3 inoculações intervaladas de 10 dias, as aves produziram os anticorpos específicos, detectados por imunodifusão, sem qualquer alteração clínica.

4.5 Produção de antígeno para imunodifusão

Para produção de antígeno de nucleoproteína (N) para imunodifusão, fizemos a inoculação de PR8: Strain A/ Puerto Rico/ 8/ 1934 H1N1 de influenza A titulado em 1/512 em membrana cório-alantóide de ovos embrionados de 10 dias, após o deslocamento da câmara de ar. Os embriões foram inoculados com o volume de 0,1 mL de vírus de líquido cório-alantóide, diluído a 10^{-3} e incubados a 37°C / 60% umidade relativa (IP70D, Premium Ecológica, Belo Horizonte, Brasil) durante 18-24 horas. Esse tempo é o exigido para a produção exclusiva da nucleoproteína dos vírus (comum a todos os tipos de influenza A) e não produção de víriões completos.

Após coletadas, as membranas inoculadas foram lavadas em (PBSX) autoclavada, seguidas de maceração, utilizando o gral e pistilo. Após esse processo, o material foi congelado e descongelado 3 vezes, por imersão em nitrogênio líquido seguido de banho maria a 30°C para promover ruptura das células e liberação do antígeno livre na solução. O material foi transferido para tubos novos e estéreis de 50 mL e centrifugados a 800 rpm / 4°C durante 10 minutos. O líquido sobrenadante foi coletado, fracionado em alíquotas de 1 ml e armazenados a -20°C para a utilização como antígeno.

4.6 Imunodifusão em géil ágar (IDGA)

A metodologia utilizada está publicada no capítulo 2.3.4 do manual terrestre da OIE (2012).

Placas de Petri estéreis e plásticas com espessura de 2-3 mm foram utilizadas preenchidas com 10 ml de géil em fase líquida. Após 4 horas à temperatura ambiente, o géil se encontra em fase sólida e pronto para manipulação. Usando um cortador (roseta), poços de aproximadamente 2 mm de diâmetro foram cortados no ágar. Os reagentes de teste, antígeno no centro e soros na periferia, foram colocados nos poços, adicionados no volume de 10 μ L. O padrão de distribuição dos controles positivos obedeceu uma distribuição planejada na posição norte e sul da roseta, conforme apresentado na figura 3. Após 24-72 horas à temperatura ambiente, uma linha contínua, transversal, deve ser observada entre os poços de amostras positivas e o antígeno no poço central. Na leitura do resultado, para melhor visualização do teste, foi utilizado fundo negro e lupa de precisão e exposição à luz indireta. O encontro dos anticorpos e antígeno resulta em precipitação em formação de linha opaca no local. A ausência da linha indica resultado negativo. A formação de identidade com o soro controle positivo

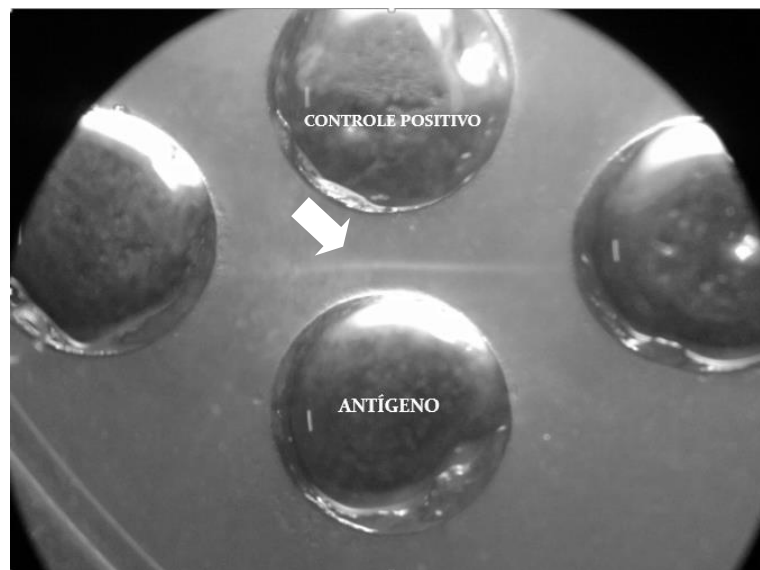


Figura 3: Reação positiva entre o controle e o antígeno. [Consiste no encontro dos anticorpos da amostra sorológica e antígenos, que geram precipitação em formação de linha (seta) opaca no local. A ausência da linha indica resultado negativo].

4.7 Inibição da hemaglutinação (IH)

A metodologia utilizada está publicada no capítulo 2.3.4 do manual terrestre da OIE, (2012).

Todos os soros positivos nos testes de IDGA foram submetidos à IH utilizando como antígeno vírus PR8: Strain A/ Puerto Rico/ 8/ 1934 H1N1 de influenza A na titulação de 1/128 determinadas por hemaglutinação em retrotitulação para obtenção de 4 UHA.

No protocolo de IH foram utilizadas placas de 96 poços com fundo em "V" e quatro unidades hemaglutinantes (4 UHA). Adicionamos 0,025 mL de PBS em cada poço da placa com fundo em "V", seguido de 0,025 mL de cada soro positivo nos primeiros poços da placa. Realizamos retrotitulação no volume de 0,025 do soro ao longo da placa, adicionamos 4 unidades hemaglutinantes (4 UHA) de antígeno/vírus no volume de 0,025 mL em cada poço e deixamos por 30 minutos à temperatura ambiente. Adicionamos 0,025 mL de suspensão de hemácias a 1% em cada poço, misturar delicadamente, esperar 40 minutos à temperatura ambiente.

O Título da IH é indicado pela maior diluição de soro causando inibição de 4 UHA de antígeno.

5. RESULTADOS

Dentre as 704 amostras analisadas, foram detectadas oito (n=8) positivas pelo teste de imunodifusão em géll ágar, todas da região metropolitana de Belo Horizonte.

Duas aves positivas em Ribeirão das Neves (amostras RB13 e RB21), duas aves positivas em Lagoa Santa (amostras LG4 e LG15), uma ave anatóidea (pato) positiva nas redondezas da Cidade Administrativa de Belo Horizonte (amostra P4) e três amostras de um comerciante localizado na região central de Belo Horizonte (amostras MC5, MC7 e MC13).

Totalizando uma ocorrência de 1,13 de amostras positivas, sendo 1,56% somente na região metropolitana de Belo Horizonte. Não houve ocorrência de anticorpos nas aves amostradas na região de Santa Maria/RS.

Tabela 4: Local de coleta , número de amostras e resultados dos exames de imunodifusão em géll ágar para influenza A e inibição da hemaglutinação em soros de aves da Região Metropolitana de Belo Horizonte/MG.

Região metropolitana de Belo Horizonte/MG	Amostras	IDGA	IH anti H1
Cidade Administrativa (Patos)	5	1	1
Rotina laboratório	39	0	0
Sabará	20	0	0
Ribeirão das Neves	32	2	0
Pedro Leopoldo	32	0	0
Confins	32	0	0
Lagoa Santa	32	2	2
Betim	32	0	0
Contagem	32	0	0
Região central BH (comerciante)	64	3	3
6 Propriedades em Belo Horizonte	192	0	0
Total	512	8	6

Das oito amostras positivas confirmadas pelo teste de imunodifusão em géll ágar, seis foram positivas para presença de anticorpos anti H1 pela inibição da hemaglutinação.

Tabela 5: Inibição da hemaglutinação para anticorpos contra o subtipo H1 das amostras da região central de Belo Horizonte (MC5, MC7 e MC13), de Lagoa Santa (LG4 e LG15), da cidade administrativa de Belo Horizonte (P4), e de Ribeirão das Neves (RB13 e RB21) em Minas Gerais.

AMOSTRA*	HI anti H1** - TITULAÇÃO	log ₂
MC5	1/64	6
MC7	1/64	6
MC13	1/32	5
LG4	1/32	5
LG15	1/64	6
P4	1/16	4
RB13	0	0
RB21	0	0

*Amostras previamente testadas reagentes em IDGA para influenza A.

** A/ Puerto Rico/ 8/ 1934 H1N1.

As amostras RB13 e RB21 (Ribeirão das Neves), embora reagentes em IDGA, não reagiram em IH, indicando que não possuem anticorpos anti H1. Todas as demais amostras confirmam a presença de anticorpos inibidores da hemaglutinação anti H1.

6. DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos na triagem, deve-se ressaltar primeiramente o perfil das propriedades envolvidas na pesquisa. O perfil dos sistemas de produção familiar com galinhas de fundo de quintal envolve a criação extensiva, ao pasto, com aves e mamíferos domésticos soltos, enfrentando os desafios impostos pelo ambiente. As condições de sanidade são muitas vezes negligenciadas e a aproximação a outras espécies, como aves de vida livre, animais silvestres, suínos e os humanos, são fatores de risco para a disseminação de diversos agentes etiológicos. É importante ressaltar que essa interação promove focos de risco de doenças emergentes, inclusive zoonoses. Sendo assim, não somente as aves silvestres representam fator de risco para a disseminação da doença (Brentano *et al.*, 2006), como as de subsistência também exercem papel importante na circulação e manutenção do vírus.

Os índices encontrados no presente estudo não puderam ser comparados com resultados prévios em aves da avicultura familiar, pela falta de pesquisa prévia nesta categoria de aves.

Um estudo epidemiológico de influenza A foi desenvolvido com ferramentas moleculares para a pesquisa em aves residentes domésticas, silvestres e migratórias no Brasil em 2009, onde 671 aves foram testadas com 18 amostras positivas, obtendo uma ocorrência de 2,6% (Golono, 2009). Enquanto outro estudo realizado em 2013 em aves migratórias na região costeira da Amazônia, com 1093 amostras, revelou uma ocorrência de 0,82% com 9 aves positivas por RT-PCR (Hurtado, 2013). A combinação dos resultados desses estudos e deste trabalho ampliam o conhecimento do status epidemiológico do vírus no Brasil.

Um estudo desenvolvido na Nigéria, em 2016, após a ocorrência de grande surto, em centenas de propriedades e com grande impacto econômico, demonstrou uma prevalência total de 4.4% em ensaios de ELISA e inibição da hemaglutinação (Oluwayelu *et al.*, 2015) dos tipos H3N8 e H5N2, os títulos encontrados para anticorpos anti-H1 por IH variaram de 1:8 a 1:2048. A diferença pode ser devida à condição geográfica, com maior proximidade e transmissibilidade entre as populações avícolas, e por se tratar também de estirpes de alta patogenicidade, com maior conversão sorológica das aves nas regiões afetadas.

Em estudo sorológico conduzido em Granada, a análise de soros por ELISA (FlockChek* AI Ab Test, Idexx), sendo 143 de galinhas de fundo de quintal, evidenciou 27 amostras positivas, resultando em uma ocorrência de 18.8%. (Sabarinath *et al.*, 2011). Embora tenham sido também avaliadas, como em nosso trabalho, galinhas de avicultura não intensificada, os índices encontrados por esses autores foram muito superiores. As diferenças geográficas e epidemiológicas entre a ilha de Granada e a região estudada na Região Metropolitana de Belo Horizonte são potencialmente grandes. A ilha localizada no Caribe recebe a visita de aves migratórias de espécies incluídas no risco de transmissão de Influenza A, podendo significar uma prevalência mais alta que em nossa região (Colin *et al.*, 2014).

Em estudo de aves migratórias aquáticas (patos) no Texas, foram avaliadas amostras de diversas espécies e localizações, com resultados de prevalência que variaram entre 0,6 e 2%, através de testes de rRT-PCR e hemaglutinação (Ferro *et al.*, 2010). Embora os índices de prevalência estejam próximos aos encontrados neste estudo, podem não refletir uma condição epidemiológica semelhante quanto à atividade viral, tendo em vista a ocorrência de influenza A tanto em aves de vida livre como domésticas nos Estados Unidos, incluindo o estado do Texas (CDC, 2017).

As aves com resultados positivos em IDGA para influenza A e negativos para anticorpos anti-H1 em IH, detectados em Ribeirão das Neves, sugerem que houve contato prévio com vírus influenza A de outro subtipo. A ausência de sintomatologia clínica nas aves amostradas também sugere infecção por estirpe(s) com baixo índice de patogenicidade. Entretanto, a detecção de anticorpos pode recomendar maior vigilância ativa destes plantéis, tendo em vista representarem eventual risco à saúde pública e à avicultura industrial. Estes dados evidenciam a necessidade de pesquisa na região, especialmente para outros subtipos de influenza A, considerando a demonstração de anticorpos para H1N1 e H3N4 em aves domésticas e silvestres no Estado do Rio de Janeiro (Oliveira, 2001).

Sabendo da dinâmica do vírus e sua capacidade de infectar mamíferos e aves (Brown, 2004), a tríade humanos, suínos e aves exerce papel fundamental na manutenção e circulação do vírus, e à formação de novas estirpes recombinantes viáveis (Jong *et al.*, 2000). A presença de influenza A nas aves pode decorrer da presença da infecção nos humanos e outros mamíferos, como os suínos (Schaefer *et al.*, 2015), conforme já demonstrado no Brasil (Paiva *et al.*, 2003).

A infecção nas aves da avicultura familiar, ao participarem da dinâmica epidemiológica de influenza A, podem atuar na geração de diversidade viral, por mutação e recombinação, de relevância à saúde pública e avicultura industrial. O índice de ocorrência demonstrado neste trabalho, em galinhas de fundo de quintal, apesar de baixo, sugere atividade viral de influenza A e, embora aparentemente por estirpes de baixa patogenicidade, sugere também risco para a conservação de espécies silvestres em unidades de conservação na região (Marques *et al.*, 2012; Marques *et al.*, 2013).

O vírus da influenza A subtipo H1N1 possui grande importância na disseminação da doença em diversas espécies, inclusive o Homem. Em 2009 a OMS classificou a “gripe suína” como uma pandemia, de transmissão horizontal, afetando mais de 214 países, de 5 continentes com mais de 18 mil óbitos confirmados (WHO, 2010). A demonstração de anticorpos para influenza A em aves da avicultura familiar reforça a necessidade da continuidade de estratégias de biossegurança nas criações intensificadas. As ações preventivas, que incluem distanciamento, fechamento das granjas e colocação de porteira com lavagem do veículo, proibição de entrada de pessoal estranho, controle da entrada de animais domésticos e de vida livre, etc., estranhos à atividade, incluindo pragas como roedores, tem o benefício de reduzir os indicadores de risco para as diversas doenças infecto-contagiosas de relevância para a avicultura industrial, como doença de Newcastle, clamidiose, micoplasmose, coriza infecciosa, bronquite infecciosa, metapneumovirose, laringotraqueite infecciosa e cólera aviária (Moraes *et al.*, 2009).

A presença de anticorpos do subtipo H1 em aves anatídeas saudáveis e de vida livre, habitantes de lago nos jardins da cidade administrativa de Belo Horizonte pode representar fonte adicional de influenza A, pela constante movimentação, embora localizada, destes grupos de aves. Embora não haja relato de doença nestes grupos, mais estudos são necessários para obtenção de informações sobre a ocorrência de Influenza A na população de patos daquela região.

A vacinação para influenza aviária é proibida no Brasil. Para a vacinação em humanos são utilizadas preparações vacinais que contêm apenas hemaglutininas purificadas, não sendo estas vacinas infecciosas e transmissíveis, empregadas em programas de prevenção em todo o território brasileiro, dando ênfase aos grupos de maior risco, idosos e crianças e as subtipos prevalentes de influenza A H1 e H3 e influenza B.

Obtiveram-se reações inespecíficas com formação de linha opaca entre as amostras de soro das aves anatídeas (patos) pesquisados na triagem por imunodifusão. Todos integrantes do gênero Influenzavirus A possuem nucleoproteína antigênicamente similares, sendo os testes de IDGA recomendados para a pesquisa de anticorpos contra estas estruturas. O teste de imunodifusão em ágar com a utilização de nucleoproteína como antígeno possibilita a pesquisa de anticorpos para quaisquer Influenzavirus A. Em

estágios iniciais de cultivo (18-24h) concentra-se a síntese de nucleoproteína. Os testes de imunodifusão são amplamente utilizados na rotina para detectar anticorpos específicos em galinhas e perus como indicador de infecção, mas são menos eficazes para detectar anticorpos de influenza em outras aves. Deve-se considerar que o manual terrestre da OIE recomenda esse teste apenas para perus e galinhas, deixando claro que não é o melhor exame para aves de outras espécies, e que reações inesperadas podem ocorrer (OIE, 2012). Sendo assim, a utilização do teste de IH é imprescindível para confirmação dos resultados.

As amostras positivas da região central de Belo Horizonte merecem um comentário especial pela sua origem. O proprietário das aves domésticas não é o criador, embora seja comerciante não profissional e não registrado na área de alimentos. Este comércio adquire aves oriundas de diversos locais diferentes, não se realiza quarentena ou métodos de prevenção, havendo rápido abate e destinação após a aquisição de aves, que são mantidas juntas, confinadas em um pequeno lote cercado em sua própria residência. Por serem animais de criação extensiva, com indivíduos portadores de influenza A no plantel, o estresse e condições de confinamento colaboram para a magnificação e disseminação de doenças infecto-contagiosas. Portanto devemos ressaltar a importância da vigilância, monitoramento e aplicação da biossegurança (Lourenço, 2006) no manejo de animais.

O Brasil é o maior exportador de carne de frango do mundo, este setor é responsável por grande parte da renda do país e emprega milhares de pessoas. Sendo um país área livre de H5 e H7, responsáveis pela HPAI, as competências fiscais, produtores rurais e técnicos têm a responsabilidade de buscar sempre mais informações, dados e pesquisas que atuem como ferramenta para manter o país livre de influenza aviária de alta patogenicidade, não só por uma questão econômica mas também em prol da saúde pública. Em fevereiro de 2017, em nota, o presidente da Associação Catarinense de Avicultura (ACAV), José Antônio Ribas Júnior diz: “ É cada vez mais importante reforçar as barreiras nas granjas, uma vez que a sanidade das aves são o grande patrimônio do setor no Brasil, que já se beneficiou indiretamente no passado com problemas de influenza aviária em outros países. As exportações Brasileiras em geral crescem quando ocorrem surtos no mundo, uma vez que importadores decretam embargos ao produto de países atingidos. Somos o último país do mundo com relevância na atividade avícola que não tem nenhum caso de doenças que causem preocupação para o consumo”. No entanto, o Brasil está em alerta máximo após um surto de influenza de baixa patogenicidade no Chile, em Janeiro de 2017. A agroindústria Brasileira está atualmente suspendendo visitas de clientes e fornecedores por 30 dias à áreas de produção, a Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) se manifestou dizendo que a proibição de visitas já era aplicada a estrangeiros provenientes de países com focos ativos de influenza aviária, medidas que fortalecem o protocolo de biossegurança.

Este é o trabalho em avicultura familiar com maior amostragem já realizado em Minas Gerais e um dos maiores do Brasil, sua aplicabilidade pode ser difundida e ampliada. Devemos considerar a importância desses resultados como análise epidemiológica em contexto ecológico multivariado. São diversos os aspectos a serem abordados em continuidade a esta pesquisa, compreendidos e analisados para obtenção de mais dados epidemiológicos, incluindo a avaliação de outros subtipos, bem como sequenciamento genético e caracterização filogenética das estirpes.

O país passa por um momento peculiar, de alerta, e a ausência de subtipos altamente patogênicos, bem como a baixa ocorrência do vírus nas amostras pesquisadas, elucidam uma posição favorável para continuidade desses índices. No entanto, sabemos que os riscos de um surto são evidentes.

7. CONCLUSÕES

Embora um baixo índice de ocorrência de anticorpos para influenza A tenha sido detectado em aves da avicultura familiar, a ocorrência de anticorpos em aves de fundo quintal indica a possibilidade de atuarem como reservatório do vírus.

Os resultados indicam a predominância de anticorpos influenza A do subtipo H1, 75%, em concordância com o subtipo mais prevalente em humanos e mamíferos domésticos, desde a ocorrência da pandemia de influenza H1 em 2009.

25% das amostras para influenza A não reagiram em IH para H1, concluímos que os animais em questão foram expostos a estirpes de outro subtipo.

Embora tenha-se obtido pequena amostragem de patos, permitiu-se a detecção de anticorpos nesta família de aves, consideradas entre as espécies reservatório natural.

Não foram detectados anticorpos para influenza A em Santa Maria/RS, sugerindo nenhuma atividade do vírus na região.

Perspectivas futuras apontam para demanda de maiores estudos de influenza A em animais de criação de subsistência, principalmente em aves e suínos, bem como a manutenção dos programas de controle, prevenção e biossegurança.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ALEXANDER, D. J.. Avian influenza. In: *OIE Manual for diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*, 5th edn. OIE, Paris, ch 2.07.12. 2005. Available on line at: http://www.oie.int/eng/normes/MANUAL/A_00037.htm.

ALEXANDER J. D.. *Orthomyxoviridae avian influenza*. Chapter 26. *Poultry diseases*. 6 ed., 2008.

ANVISA “Agencia Nacional de Vigilância Sanitária”. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/paf/apres.htm>

BECKER, W. B. 1966. Isolation and classification of tern virus: Influenza Virus A/Tern/South Africa/1961. *Journal of Hygiene*, v.64, p. 309–320, 1966.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento Plano de prevenção à influenza Aviária em aves silvestres e de subsistência 2005. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/PNSA/Plano%20de%20Conting%C3%Aancia%20-%20Vers%C3%A3o%201_4.pdf> Acessado em: 24 Jun. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano de preparação Brasileiro para o enfrentamento de uma pandemia de influenza, 2010.

BRENTANO, L. Influenza Aviária: panorama mundial da influenza aviária e novas propostas de diagnóstico do vírus. Florianópolis - SC: V Seminário Internacional de Aves e Suínos – AveSui, 2005.

BRIDGES, C.B.; KUEHNERT, M.J; HALL, C.B. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. *Clin infect Dis*, v. 37, p. 1094-1101, 2003.

BRIDGES, C. B. LIMW, H.U., PRIMMER J., *et al.* Risk of influenza A(H5N1) infection among poultry workers, Hong Kong, 1997-1998. *J Infect Dis*, v. 185, p. 1005-10, 2002

BROWN, H. Who confirms human-to-human avian flu transmission, *Lancet* v. 363, n.9407, p. 462, 2004.

CAPUA, I., MARANGON, S. Control of avian influenza in poultry. *Emerging Infectious Diseases*, v. 12, p. 1319–1324, 2006.

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

CDC - Center for Disease Control and Prevention. Outbreaks of Avian Influenza in North America. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/avianflu/outbreaks.htm>>. Acessado em: 23 fev 2017.

CHAN, P.K. Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clin Infect Dis*. v. 4, Suppl 2, p. 58-64, 2002.

COLIN A.; GALBRAITH; JONES, T.; KIRBY, J.; MUNDKUR, T. A Review of Migratory Bird Flyways and Priorities for Management. UNEP / CMS Secretariat, Bonn, Germany. 164 pages. CMS Technical Series No. 27. 2014.

DONALÍSIO, M.R. *Revista Brasileira de Epidemiologia: Influenza Aviária – questões centrais*. v. 9. n. 1. São Paulo: editorial especial, 2006.

ELLIS, T.M., R.B.; BOUSFIELD, L.A.; BISSET, K.C. *et al.* Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathology*, n. 33 p. 492–505, 2004.

FERRO, P.J.; BUDKE, C.M.; PETERSON, M.J.; et al. Multiyear Surveillance for Avian Influenza Virus in Waterfowl from Wintering Grounds, Texas Coast, USA. *Emerging Infectious Diseases*. 16(8):1224-1230, 2010.

FLORES, E.D. *Virologia Veterinária*. 1.ed. Santa Maria: UFSM, 2007. 888p.

FOUCHIER, R.A.; SCHNEEBERGER, P.M.; ROZENDAAL, F. W. *et al.* 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. In *Proceedings National Academy of Science, U.S.A.* n.101: p. 1356–1361, 2004.

FUNASA/ANVISA - Ações de engenharia em saúde pública para o atendimento de casos de síndrome respiratória aguda grave – SRAG. 2001. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/svs/epi/sars/arquivos/orient_engenharia.doc>. Acessado em 15 fev 2017.

GOLONO, M.A. Epidemiologia e caracterização molecular de vírus da Influenza em aves residentes e migratórias no Brasil. 2009. 103f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – USP/ Instituto Butantan/ IPT, São Paulo

GRAZIANO, K.U.; SILVA, A.; BIANCHI, E.R.F. Métodos de proteção anti-infecciosa. In: FERNANDES, A.T. Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde. São Paulo, Atheneu, p 266-308, 2000.

HAYDEN, F.G.; BELSHE, R.; VILLANUEVA, C., *et al.* Management of influenza in households: a prospective, randomized comparison of oseltamivir treatment with or without postexposure prophylaxis. *J Infect Dis*, n. 189, p.440-9, 2004.

HIEN, T.T; LIEM, N.T.; DUNG, N.T., *et al.* Avian influenza A (H5N1) in 10 patients in Vietnam. *New Engl J Med*; n. 350, p. 1179-88, 2004.

HINSHAW, V.S.; AIR, G.M.; GIBBS, A.J. et al. Antigenic and genetic characterization of a novel hemagglutinin subtype of influenza A viruses from gulls. *Journal of Virology*, v. 42 p. 865–872, 1982

HURTADO, R.F. Vigilância epidemiológica dos virus da Influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia. 2013. 124f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

IBIAPINA, C.C; COSTA, G.A; FARIA, A.C.. *Jornal Brasileiro de Pneumologia: Influenza A aviária (H5N1) – A gripe do Frango*. v. 31, n. 5, São Paulo, 2005.

JONG, J.C de.; RIMMELZWAAN, G.F.; FOUCHIER, R. A. M. et al. Influenza Virus: a Master of Metamorphosis. *Journal of Infection*. 2000.

LEE, C.W.; SUAREZ, D.L. Application of real-time RT-PCR for the quantization and competitive replication study of H5 and H7 subtype avian influenza virus. *Journal of Virological Methods*, v. 119, Issue 2, p. 151-158, 2004.

LIEM N.T. World Health Organization International Avian Influenza Investigation Team, Vietnam, Lim W. Lack of H5N1 avian influenza transmission to hospital employees, Hanoi, 2004. *Emerg Infect Dis*, n. 11, p. 210-5, 2005;

LOURENÇO, P.S. Influenza Aviária: V Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM. Santa Maria – RS, 2006. Disponível em: www.cnpas.embrapa.br/down.php?tipo=publicacoes&cod_publicacao=875.>. Acessado em 15 fev 2017.

MAPA “Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento”. 2006. Instrução normativa n. 17, de 7 de abril de 2006. Publicada na edição n. 69, de 10 de abril de 2006, do Diário Oficial da União.

MAPA “Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento”. Manual de procedimentos (versão Santa Catarina). Fevereiro, 2006b Disponível em:

<<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/noticias/PlanodaAgriculturaSC.pdf>>. Acessado em 15 fev 2017.

MAPA “MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO”. Plano de contingência para Influenza Aviária e doença de Newcastle, Abril, 2007. Versão 1.2. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acessado em 16 fev 2017.

MAPA “MINISTÉRIO DE AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO”. Plano Brasileiro de Preparação para uma Pandemia de Influenza 3a versão. Abril de 2006. Disponível em: <www.cve.saude.sp.gov.br/htm/resp/influ_plano3ver.pdf> Acessado em 17 fev 2017.

MARQUES, M. V. R., FERREIRA JR., F.C., ANDERY, D. A., FERNANDES, A. A., ARAUJO, A. V., RESENDE, JOSÉ SÉRGIO de, MARTINS, N. R. da SILVA. Health Assessment of Captive Tinamids (Aves, Tinamiformes) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* , v.43, p.539 - 548, 2012.

MARQUES, M. V. R., FERREIRA JR, F. C., DE ASSIS ANDERY, D., FERNANDES, A. A., DE ARAÚJO, A. V., DE RESENDE, J. S., DA SILVA MARTINS, N. R. Serologic, Parasitic, And Bacteriologic Assessment of Captive Cracids (Aves: Galliformes: Cracidae) in Brazil. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine.* , v.44, p.27 - 34, 2013.

MARTINS, N.R.S. Influenza Aviária: uma revisão dos últimos dez anos. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 3. n. 2, Campinas, 2001.

MARTINS, N.R.S. An Overview on Avian Influenza. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v. 14. n. 2, Campinas, 2012, p. 71-158.

MEAD, K.; JOHNSON, D. A evaluation of portable high-efficiency particulate air filtration for expedient patient isolation in epidemic and emergency response. *Ann Emerg Med*, n. 44: p. 635-645, 2004

MOUNTS A.W.; KWONG, H.; IZURIETA, H.S. *et al.* Casa-control study of risk factors for avian influenza A (H5N1) disease, Hong Kong, 1997. *J. Infect Dis.* n. 180, p. 505-8, 1999

MORAES, H.L.S; SALLE, C.T.P.; CARON, L.F. Influenza Aviária. Doenças das Aves. 2 ed. BERCHIERI JUNIOR *et al.*, Campinas fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, v.1, p. 611-626, 2009

NUNES, M. F. C., LACERDA, R. ROOS, A. et al. Aves Migratórias na Amazônia e a Gripe Aviária. Centro de Pesquisa para a Conservação de Aves Silvestres (Cemave), 2006. Disponível em:

<<http://www.fmt.am.gov.br/imprensa/aves%20migratorias%20amazonia%20e%20gripe%20aviaria.pdf>>. Acessado em: 15 fev 2017.

OIE. Disease Information 2015. Disponível em: <http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/WI>. Acessado em: 26 Jun. 2015.

OIE Terrestrial Manual. Capítulo 2.3.4. Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses) http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.03.04_AI.pdf. OIE Terrestrial Manual 2015. Acesso em 26 Jun 2015.

OIE. Avian Influenza Portal. 2017. Disponível em: < <http://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/web-portal-on-avian-influenza/>> Acessado em: 10 Jan 2017.

OIE. Disease outbreak maps. World Animal Health Information Database (WAHIS Interface). 2017 Disponível em: < http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseaseoutbreakmaps?disease_type_hidden=0&disease_id_hidden=15&selected_disease_name_hidden=Highly+path.+avian+influenza+%28+-%29+&disease_type=0&disease_id_terrestrial=15&disease_id_aquatic=-999&selected_start_day=1&selected_start_month=1&selected_start_year=2014&selected_end_day=1&selected_end_month=12&selected_end_year=2016&submit2=OK> Acessado em: 2 Jan 2017

OLIVEIRA, J.R., J.G. et al . Avaliação soropidemiológica do vírus influenza em aves domésticas e silvestres no Estado do Rio de Janeiro. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 53, n. 3, p. 299-302. 2001

OLUWAYELU, D.O. OLULADUN, C. AIKI-RAJI. et al. "Serological Survey for Avian Influenza in Turkeys in Three States of Southwest Nigeria," *Influenza Research and Treatment*. Article ID 787890, 2015.

OMC "ORGANIZACIÓN MUNDIAL DEL COMERCIO". El Comité SPS aborda la 'regionalización' 2006. Disponível em: <http://www.wto.org/spanish/news_s/news06_s/sps_feb06_s.htm>. Acessado em 15 fev 2017.

OMS "Organização Mundial da Saúde". Avian influenza A (H5N1). Weekly Epidemiological Record (WER) v.1, nº.79, p.41-2, 2004.

OPAS "ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE". 2005a. Encontro mundial sobre influenza estabelece ações essenciais e concorda sobre necessidade urgente de financiamento. Disponível em <http://www.opas.org.br/influenza/uploadArq/Encontro_Mundial_sobre_Influenza.pdf>. Acessado em 15 fev 2017.

OPAS "Organização Pan-Americana de Saúde". Questões mais frequentes sobre a Influenza Aviária. 2005b. Disponível em <http://www.opas.org.br/influenza/UploadArq/Quest%C3%B5es_Frequentes_sobre_a_Influenza_Avi%C3%A1ria.pdf>. Acessado em 15 fev 2017.

OPAS "ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE". Controle de infecção e organização de serviços de saúde para o enfrentamento de uma pandemia de influenza aviária. 2005c. Informe técnico. Disponível em <<http://www.opas.org.br/gentequefazsaude/bvsde/bvsacd/cd49/pandemia.pdf>>. Acessado em 15 fev 2017.

OPAS "ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE". Influenza aviária H5N1 em gatos domésticos. 2006. p. 1-2. Disponível em: <[http://www.opas.org.br/influenza/UploadArq/28_de_fevereiro_de_2006_\(83\).pdf](http://www.opas.org.br/influenza/UploadArq/28_de_fevereiro_de_2006_(83).pdf)> Acessado em 15 fev 2017.

OPAS "ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE", Influenza aviária H5N1: Cronologia. p. 1-35 Disponível em: <http://www.opas.org.br/influenza/uploadArq/Influenza_avi%C3%A1ria_cronologia_2007.pdf>. Acessado em 15 fev 2017.

OLSEN, B.; MUNSTER, V.J.; WALLENSTEN, A. J. *et al.* Fouchier. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, v. 312, p. 384–388, 2006.

PAIVA, T.M. et al . Occurrence of influenza B/Hong Kong-Like strains in Brazil, during 2002. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, São Paulo , v. 45, n. 1, p. 51-52, 2003

SABARINATH, A.; SABARINATH, G.P.; TIWARI, K.P.; et al. Virological and Serological Surveillance of Avian Influenza Virus in the Birds of Grenada. *International Journal of Poultry Science* 10 (8): 579-582, 2011 ISSN 1682-8356, 2011

SANHONG, L.; PANG, L.; RUAN, S.; ZHANG, X.; Global Dynamics of Avian Influenza Epidemic Models with Psychological Effect. Hindawi Publishing Corporation, 2015.

SANTOS, B.M.; MOREIRA, M.A.S; DIAS, C.C.A. Manual de doenças avícolas. Viçosa, MG: Ed UFV, p. 40-45, 2009.

SCHAEFER, R.; RECH, R.R.; GAVA, D. et al. A human-like H1N2 influenza virus detected during an outbreak of acute respiratory disease in swine in Brazil. *Arch Virol*. 2015.

SHORTRIDGE, K.F.; ZHOU, N.N.; GUAN, Y. *et al.* Characterization of avian H5N1 influenza viruses from poultry in Hong Kong. *Virology* v. 252, p. 331–342, 1998.

SCHULTSZ, C.; DONG, V.C.; CHAU, N.V.V., *et al.* Avian influenza H5N1 and healthcare works. *Emerg Infect Dis*, v. 11, p. 1158-9, 2005.

SILVIA, L.J. Influenza Aviária e Risco de pandemia, situação atual e perspectivas. *Prática Hospitalar*, ano VIII, n 48, nov-dez, 2006.

SPACKMAN, E.; STALLKNECHT, D. E.; SLEMONS, R.D., et al. Phylogenetic analysis of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation. *Virus Research* v.114, p. 89–100, 2005.

STALLKNECHT, D.E BROWN, J.D.; SWAYNE D.E. et al. Persistence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses in Water. *Avian Diseases*, 2006.

STALLKNECHT, D.E.; NAGY, E.; HUNTER, D.B.; SLEMONS, R.D. Avian Influenza. Infectious diseases of wild birds; edited by NANCY J. THOMAS, D. BRUCE HUNTER, CARTER T. Atkinson. 2007.

SWAYNE, D.E.; HALVORSON, D.A. et al. Diseases of poultry. Ames: Blackwell Publishing, 2008.

TONG, S. ; ZHU, X. ; LI, Y. et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS pathogens*, 2013.

TRAN TINH HIEN, M.D., NGUYEN THANH LIEM, M.D., NGUYEN THI DUNG, M.D., *et al.*, Avian Influenza A (H5N1) in 10 Patients in Vietnam. *The new england journal of medicine*, v.350, n. 12, p. 1179 – 88, março, 2004, 484p.

VRAMJAC, A. Revista de Saúde Pública: Influenza Aviária e casos em Humanos. São Paulo: informes técnicos institucionais, v. 40, n. 1, 2006.

WHO “WORLD HEALTH ORGANIZATION”. Avian influenza ("bird flu"). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html>. Acessado em: 16 Fev 2017.

WHO “WORLD HEALTH ORGANIZATION”. Pandemic (H1N1) 2009 – update 112. 2010

YEE, K.S; CARPENTER, T.E; CARDONA, C.J. Epidemiology of H5N1 avian influenza. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32, p. 325–340, 2009.

ZHU, H.; HUGHES, J.; MURCIA, P. Origins and Evolutionary Dynamics of H3N2 Canine Influenza Virus. *J. Virol.* 89, p. 5406-5418, 2015.