

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

ILIANI BIANCHI

ESTUDO DO VÍRUS INFLUENZA A EM AVES MIGRATÓRIAS E RESIDENTES NO  
NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL, NO PERÍODO DE 2004-  
2007.

Campos dos Goytacazes – RJ  
2008

ILIANI BIANCHI

ESTUDO DO VÍRUS INFLUENZA A EM AVES MIGRATÓRIAS E RESIDENTES NO  
NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL, NO PERÍODO DE 2004-  
2007.

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito  
parcial para obtenção do grau de doutor em  
Produção Animal, na área de concentração  
de Sanidade Animal.

ORIENTADOR: Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos

Campos dos Goytacazes - RJ

2008

ILIANI BIANCHI

ESTUDO DO VÍRUS INFLUENZA A EM AVES MIGRATÓRIAS E RESIDENTES NO  
NORTE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL, NO PERÍODO DE 2004-  
2007.

Tese apresentada ao Centro de Ciências e  
Tecnologias Agropecuárias da  
Universidade Estadual do Norte  
Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito  
parcial para obtenção do grau de doutor em  
Produção Animal, na área de concentração  
de Sanidade Animal.

Aprovada em 26 de março de 2008.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Cláudio de Moraes Andrade (Doutor, Microbiologia) – PESAGRO/RJ

---

Prof. Claudio Baptista de Carvalho (Doutor, Clínica Veterinária) – UENF

---

Prof. Ronaldo Novelli (Doutor, Ciências Ambientais) - UENF

---

Prof. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos (Doutor Microbiologia) – UENF  
(Orientador)

À minha mãe, minha irmã e minha sobrinha.

DEDICO.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, que é minha fortaleza e esteve ao meu lado durante esses anos;

À minha mãe Carmorina Bonfá, que me ensinou a buscar Deus, a ser firme nas decisões e buscar sempre o amor;

A Ivânea, uma irmã protetora que me estraga com seus mimos e que me presenteou com uma florzinha que acaba de nascer Bianca;

Aos meus irmãos Ildelfonso, Inácio e Ildeberto, que estão sempre preocupados querendo saber de tudo o que está acontecendo e que me passam muita segurança;

A uma grande amiga de todas as horas, que amo muito: Giselda;

Aos meus amigos do Grupo de Oração Universitário, Cristiana (Cris), Edenilson (Denis Pimentinha), Anna Rosa (Anita), Marcos Fabio, Juscelina (Juscy), Liliana (Lili), Juliana (Xulé), Diogo (Dioguito), Elber (Elbinho), Adilson e outros que não estão citados aqui, mas que foram fundamentais também para a construção desse projeto;

Ao professor Carlos Eurico que sempre esteve presente nas inúmeras saídas a campo, muito obrigada por esses seis anos de orientação;

Ao meu co-orientador professor Novelli pelo grande incentivo e por me ensinar tudo sobre as aves marinhas;

Ao professor Cláudio Andrade pelos ensinamentos das técnicas virológicas e pelo grande incentivo e ajuda para realizar essa pesquisa;

Ao professor Cláudio Baptista;

Ao grande amigo e co-orientador professor Leonardo Serafim, obrigada pelo incentivo de todas as horas;

Aos técnicos do Laboratório de Sanidade Animal, Gina (mais uma incentivadora), Luciana Lemos e Claudia;

A Luz Alba e Gabrielle pelo acolhimento e ensinamento nas técnicas virológicas;

Aos amigos de pós, Francimar (um dia eu chego lá), André, Inarei, Alessa, Giliana, Aline e Tiago;

A Etiene, Jovana e meninas da biblioteca, muito obrigada;

A todos que não mencionei o nome, mas foram fundamentais para a execução deste trabalho;

A CAPES, IBAMA-CEMAVE e UENF.

**“Deus perdoa sempre,  
o ser humano às vezes,  
a natureza nunca.”**

## RESUMO

### **Estudo do vírus influenza A em aves migratórias e residentes no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil, no período de 2004-2007.**

A influenza aviária é uma doença causada pelo vírus influenza A da família *Orthomyxoviridae* e é distribuída mundialmente. Aves silvestres são os reservatórios naturais do vírus. O objetivo deste estudo foi monitorar a circulação do vírus influenza A em aves costeiras migratórias e residentes, capturadas em redes ornitológicas no Norte do Estado do Rio de Janeiro. Paralelamente foi realizada a biometria e anilhamento de cada ave capturada. As 342 amostras fecais coletadas foram inoculadas na cavidade alantóide de ovos embrionados de 9 a 11 dias. O líquido alantóico foi testado para a presença de vírus hemaglutinantes pelo teste de hemaglutinação. Das 342 amostras analisadas, 39 foram positivas para o teste de hemaglutinação. Essas amostras foram submetidas ao RT-PCR e todas foram negativas para o vírus influenza A. Apesar dos resultados negativos é necessário o monitoramento constante de aves migratórias a fim de realizar uma vigilância epidemiológica para o vírus influenza.

**Palavras Chave:** vírus influenza, aves migratórias, aves residentes, teste de hemaglutinação, RT-PCR.

## **ABSTRACT**

### **Research of influenza A virus in migratory birds and resident in northern state of Rio de Janeiro, Brazil in 2004-2007.**

Avian influenza is caused by influenza A viruses of the Family Orthomyxoviridae and is distributed worldwide. Wild birds are known to be natural reservoir for viruses. The objective of this study is monitoring the circulation of influenza virus in migratory and resident coastal birds captured in ornithological nets. It was made the biometry and marked of each captured bird. The 342 collected fecal samples were inoculated into the allantoic cavity of 9-to-11-day of embryonating chicken egg. Allantoic fluid was tested for the presence of hemagglutinating viruses by the hemagglutination assay. Of the 342 analyzed samples, 39 had been positive for the hemagglutination assay. These samples had been submitted to the RT-PCR and all had been negative for the virus of influenza A. We did not detect avian influenza A but is need for monitoring wild birds for presence of influenza A viruses.

**Key words:** Avian influenza, migratory birds, resident birds, hemagglutination assay, RT-PCR.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1. Histórico.....	16
2.2. Etiologia e propriedade geral dos vírus.....	20
2.3. Epizootiologia.....	20
2.4. Manifestações clínicas.....	23
2.5. Diagnóstico.....	23
2.6. Prevenção e controle.....	24
2.7. Importância econômica e sanitária.....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. Animais e captura.....	26
3.2. Local e período de captura.....	29
3.3. Coleta e processamento das fezes.....	29
3.4. Isolamento e identificação do vírus.....	30
3.4.1. Inoculação em ovos embrionados.....	30
3.4.2. Teste de hemaglutinação.....	30
3.4.3. Extração e purificação do RNA viral.....	31
3.4.4. Amplificação molecular (RT-PCR).....	31
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>32</b>
4.1. Animais.....	32
4.2. Análise das amostras.....	37
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>6. SUGESTÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>43</b>

## ÍNDICE DE QUADRO

<b>Quadro 1:</b> Países onde foram notificados casos do vírus da influenza aviária (H5N1) entre os anos de 2003 a 2008.....	17
<b>Quadro 2:</b> Países onde foram notificados casos do vírus da influenza aviária (H5N1) no ano de 2007.....	18
<b>Quadro 3:</b> Países onde foram notificados do vírus da influenza aviária (H5N1) no ano de 2008.....	18

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Vírus influenza em circulação em humanos no Brasil no período de 1995 a 2001.....	19
<b>Figura 2.</b> Disseminação do vírus influenza interespecies.....	21
<b>Figura 3:</b> Redes ornitológicas armadas para capturas de aves no Mangue Carapeba – Campos dos Goytacazes – RJ (2007).....	27
<b>Figura 4.</b> Base das saídas a campo, Mangue Carapeba, Campos dos Goytacazes – RJ (2007).....	27
<b>Figura 5.</b> Box individuais para conter as aves. Mangue Carapeba, Campos dos Goytacazes - RJ (2007).....	28
<b>Figura 6:</b> <i>Arenaria interpres</i> , capturada no Mangue Carapeba, Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.....	33
<b>Figura 7:</b> <i>Charadrius collaris</i> , capturada no Mangue Carapeba, Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.....	33

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1:</b> Porcentagem de aves migratórias e residentes capturadas na Região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, 2004 a 2007.....	34
<b>Gráfico 2:</b> Porcentagem das espécies capturadas na Região Norte Fluminense, nos anos de 2004 a 2007.....	36

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Número de aves capturadas nos anos de 2004 a 2007, agrupadas por espécies e <i>status</i> .....	35
<b>Tabela 2:</b> Espécies de aves positivas no teste de hemaglutinação com respectivos títulos hemaglutinantes e <i>status</i> .....	38

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCTA/ UENF 064/2008

Bianchi, Iliani

Estudo do vírus influenza A em aves migratórias e residentes no Norte do Estado do Rio de Janeiro, Brasil no período de 2004-2007 / Iliani Bianchi. – 2008.

51 f. : il.

Orientador: Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos

Tese (Doutorado em Produção Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2008.

Bibliografia: f. 43– 51.

1. Vírus influenza 2. Ave migratória 3. Ave residente 4. Teste de hemaglutinação 5. RT-PCR I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD– 598.1568

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as informações sanitárias do *Office Internacional des Epizooties* (OIE) e do *Center for Diseases Control* (CDC) vêm relatando a ocorrência, principalmente nos Estados Unidos da América, de surtos de viroses de importância tanto para a Medicina Veterinária como para a Saúde Pública, entre elas a Influenza Aviária, a doença de NewCastle e, mais recentemente, a febre do Oeste do Nilo. (OLSEN *et al.*, 2000; LANCIOTTI *et al.*, 1999).

Do ponto de vista epidemiológico, sabe-se que as aves migratórias desempenham papel importante na disseminação dessas viroses, já que elas são consideradas os principais reservatórios desses vírus na natureza. Essa particularidade é importante tendo em vista que existem 73 espécies de aves migratórias oriundas do Hemisfério Norte que se deslocam até a América do Sul (VOOREN, *et al.*, 1999), representando, dessa forma, um risco em potencial para a introdução desses agentes no Brasil, principalmente entre os meses de setembro e maio, período de passagem dessas aves neste território (NOVELLI, 1997; LUNA *et al.*, 2003).

Com relação à influenza aviária, a hipótese atual considera as aves aquáticas, principalmente da ordem *Anseriformes*, como principais reservatórios naturais de vírus influenza A na natureza. Dessas espécies haveria a transmissão para todas as demais espécies de aves aquáticas (ALEXANDER, 2000; OLSEN *et al.*, 2006; ALEXANDER *et al.*, 2007).

Em mamíferos, evidências filogenéticas sugerem que todos os vírus influenza A têm um ancestral aviário (WEBSTER *et al.*, 1992). As pandemias de vírus influenza em humanos ocorridas em 1957 e 1968 na Ásia e em Hong Kong, respectivamente, foram originadas pela transferência de genes de vírus aviário para vírus de origem humana (KAWAOKA *et al.*, 1988), apesar de existir barreira entre espécies, já que, de maneira geral, os vírus de origem humana não se replicam bem em aves e vice-versa (HINSHAW *et al.*, 1981). A teoria aceita até 1997 era a de que a replicação e reagrupamento de genes precisavam de um hospedeiro intermediário susceptível ao vírus influenza aviário e humano, papel desempenhado pelos suínos. Entretanto, no

final da década de 90, vários trabalhos demonstraram as primeiras evidências da transmissão direta de vírus influenza aviário para humanos (KURTZ *et al.*, 1996; SUBBARAO e KATZ 2000). Um episódio que chamou particular atenção foi o que ocorreu em Hong Kong em 1997, onde um vírus influenza aviário altamente patogênico (HPAIV), H5N1, foi transmitido diretamente de aves para humanos ocasionando a morte de 6 das 18 pessoas infectadas (CLAAS *et al.*, 1998). Em 2003 novos casos fatais causados pelo HPAIV H5N1 ocorreram na China (STURM-RAMIREZ *et al.*, 2004) e, no começo de 2004, 23 das 34 pessoas infectadas pelo HPAIV H5N1 morreram no continente Asiático (HIEN *et al.*, 2004).

Além do H5N1, outros vírus influenza aviários têm causado surtos em humanos, como por exemplo, o subtipo H9N2 no sul da China e Hong Kong em 1999 (LIN *et al.*, 2000). Em 2003 outro HPAIV H7N7 infectou 89 pessoas na Holanda causando a morte de um veterinário. Depois desse episódio o vírus se espalhou rapidamente para a Bélgica e Alemanha, onde mais de 30 milhões de aves industriais foram sacrificadas como medida de controle (FOUCHIER *et al.*, 2004).

Todos esses relatos demonstram claramente que a transmissão zoonótica de vírus influenza aviário diretamente para humanos pode ocorrer, alertando, dessa forma, a necessidade de uma vigilância constante da circulação de vírus influenza em aves silvestres, justificada pelo risco em potencial que alguns desses vírus possam causar novas pandemias.

A emergência de novas doenças a partir de espécies silvestres é um acontecimento que requer vigilância permanente, a fim de montar planos estratégicos para o controle da doença, impedindo que se transforme em uma ameaça para a saúde pública e para a conservação das espécies (BRENTANO, 2006).

Nas Regiões Norte Fluminense e Baixada Litorânea do Estado do Rio de Janeiro, existe um complexo de lagoas (Lagoa do Açú, Lagoa de Iquipari, Lagoa Feia, Lagoa de Cima, entre outras) que são importantes pontos de repouso e alimentação de várias espécies de aves migratórias, oriundas do Canadá, EUA e Alasca. Além dessas lagoas, algumas ilhas nas proximidades de Macaé, Cabo Frio e São João da Barra (Atafona) também são importantes pontos para aves migratórias, como os trinta-réis-de-bico-amarelo (*Sterna eurygnata*), trinta-réis-de-bico-vermelho (*Sterna hirundinacea*) e



trinta-réis-boreal (*Sterna hirundo*). Essa característica peculiar na região favorece a realização de um programa de vigilância epidemiológica em aves migratórias.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Histórico

Quando se fala em influenza não se pode deixar de falar das quatro importantes pandemias mundiais, a gripe Espanhola entre 1918-1920; a gripe Asiática entre 1957-60, a de Hong Kong entre 1968-1972 e a gripe Russa ocorrida em 1977-1978 que afetou principalmente crianças e adolescente (BARROS *et al*, 2004).

Juntas essas pandemias foram responsáveis pelo óbito de milhões de pessoas, matando mais que a primeira e a segunda guerra mundial (KOLATA, 2002), e foi a partir daí que se iniciou o estudo da influenza em busca do conhecimento, controle e prevenção da doença.

Depois dessas grandes pandemias, ocorreram vários surtos de influenza em vários países que não tiveram grandes conseqüências, mas no ano de 1997, em Hong Kong, ocorreu o primeiro caso de transmissão direta de influenza aviária para humanos, pela estirpe FLU A (H5N1), provocando 18 casos e 6 óbitos (TAM, 2002).

Em abril de 2003 ocorreram importantes surtos de influenza aviária na Holanda e na Bélgica devido a FLU A (H7N7), que levou a óbito um veterinário e doença leve em 83 pessoas (FOUCHIER *et al.*, 2004).

Em dezembro de 2003, uma criança, em Hong Kong, foi infectada pelo vírus influenza A (H9N1) manifestando doença leve. No mesmo mês e ano ocorreu um surto de influenza aviária em humanos pela estirpe A (H5N1) com confirmação de 11 casos e 8 óbitos, esse surto teve início no Vietnã progredindo para a Tailândia (CDC, 2004a; CDC, 2004b).

Entre os anos de 2003 a 2008, a influenza aviária (H5N1) foi registrada em 61 países (Quadro 1), entre esses, 28 foram no ano de 2007 (Quadro 2) e 12 no primeiro trimestre do ano de 2008 (Quadro 3).

**Quadro 1:** Países onde foram notificados casos do vírus da influenza aviária (H5N1) entre os anos de 2003 a 2008.

<b>CONTINENTE</b>	<b>PAÍS</b>		
Ásia	Blangadesh	Camboja	Cazaquistão
	China	Coréia	Hong Kong
	Índia	Indonésia	Japão
	Laos	Malásia	Mongólia
	Mianmar	Paquistão	Tailândia
África	Benin	Burkina Faso	Camarão
	Costa do Marfim	Djibuti	Gana
	Níger	Nigéria	Suazilândia
	Sudão	Togo	
Europa	Albânia	Alemanha	Áustria
	Azerbaijão	Bósnia	Bulgária
	Croácia	Dinamarca	Erzegovina
	Eslováquia	Eslovênia	Espanha
	França	Geórgia	Grécia
	Hungria	Itália	Inglaterra
	Polônia	República Tcheca	Romênia
	Rússia	Sérvia e Montenegro	Suécia
	Turquia	Ucrânia	
Oriente Médio	Afeganistão	Arábia Saudita	Egito
	Irã	Iraque	Israel
	Jordânia	Kuwait	Palestina
	Vietnã		

FONTE: OIE, 2008.

**Quadro 2:** Países onde foram notificados casos do vírus da influenza aviária (H5N1) no ano de 2007.

<b>CONTINENTE</b>	<b>PAÍS</b>			
Ásia	Blangadesh	Camboja	China	
	Coréia	Hong Kong	Índia	
	Japão	Laos	Malásia	
	Mianmar	Paquistão	Tailândia	
África	Benin	Gana	Togo	
Europa	Alemanha	França	Hungria	
	Inglaterra	Polônia	República Tcheca	
	Romênia	Rússia	Turquia	
Oriente Médio	Afeganistão	Arábia Saudita	Kuwait	
	Vietnã			

FONTE: OIE, 2008.

**Quadro 3:** Países onde foram notificados do vírus da influenza aviária (H5N1) no ano de 2008.

<b>CONTINENTE</b>	<b>PAÍS</b>			
Ásia	China	Índia	Laos	Tailândia
Europa	Alemanha	Inglaterra	Turquia	Ucrânia
Oriente Médio	Irã	Israel	Vietnã	Egito

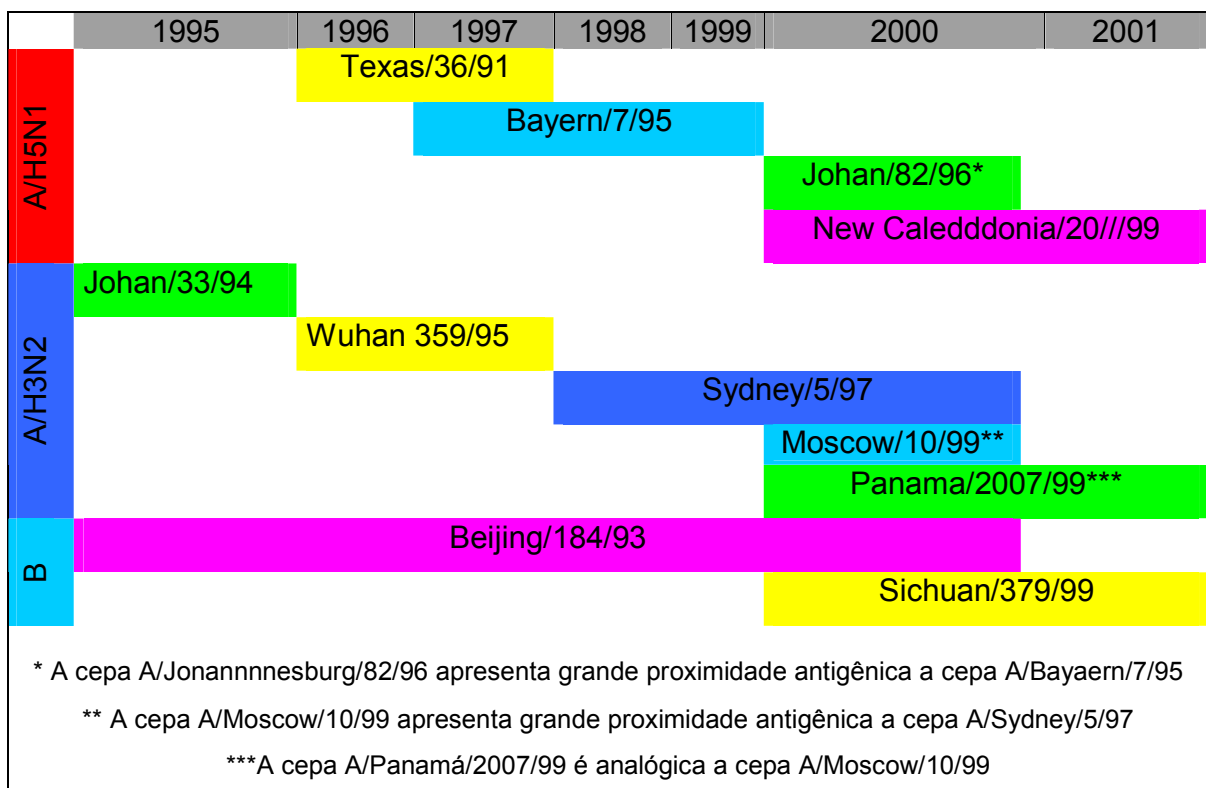
FONTE: OIE, 2008.

No continente Americano ocorreram apenas cinco casos de influenza de alta patogenicidade, três pelo subtipo H5N2 e dois pelo subtipo H7N3. Em 1983-1984, H5N2 nos EUA; em 1994-1995, H5N2 no México; em 2002 H7N3 no Chile; em 2004, H5N2 nos EUA e em 2004 H7N3 no Canadá (SENNE *et al*, 2006). Os três últimos casos tiveram como precursor um subtipo de baixa patogenicidade, comprovando a necessidade de notificar a OIE todas as ocorrências dos vírus influenza (SENNE *et al*, 2006).

No Brasil, existem poucos trabalhos publicados sobre a ocorrência de influenza em aves silvestres, Oliveira Jr *et al* (2001) demonstraram a presença do subtipo H1N1 e H3N2 no Estado do Rio de Janeiro.

Em humanos, nos anos de 1992 e 1993 um estudo em Belém do Pará, encontrou estirpes do subtipo H3N2 e H1N1 (SANTOS *et al.*, 1997). Durante janeiro a outubro de 2002, foi isolado a estirpe B/Hong Kong/330/2001, nas regiões Sudeste e Centro-Oeste. Essa estirpe é variante do vírus da influenza B/Victória/02/88, que ocorreu no Continente Asiático em 1991 (PAIVA *et al.*, 2003).

Entre 1995 e 2001, o projeto VigiGripe, no Brasil, caracterizou 9 diferentes variantes do vírus influenza A, sendo quatro do subtipo H1N1 e 5 do subtipo H3N2, sendo que de 1995 a 1999 circulou uma única cepa do tipo B a B/Beijing/184/93. A partir de 2000 iniciou a circulação da cepa B/Sichuan/379/99 (PROJETO VIGIGRIPE, 2001 citado por FORLEO-NETO *et al.*, 2003). Na figura 1 estão demonstradas as estirpes circulante no Brasil de 1995 a 2001 em humanos.



**Figura 1:** Vírus influenza em circulação em humanos no Brasil no período de 1995 a 2001. FONTE: FORLEO-NETO *et al*, 2003.

## 2.2. Etiologia e propriedades gerais do vírus

De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) os vírus influenza são classificados na família *Orthomyxoviridae*, a qual é subdividida em quatro gêneros, *Vírus influenza A, B, C* e *Thogotovirus*. Os vírus influenza são classificados nos tipos A, B e C de acordo com seu perfil antigênico (FIELDS *et al.*, 1996).

São vírus envelopados, podendo ser filamentosos ou esféricos, tamanho variando de 80 a 120nm de diâmetro, apresenta genoma RNA fita simples de polaridade negativa segmentado e possui duas glicoproteínas de grande importância que são a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) que classificam o vírus quanto ao subtipo (FIELDS *et al.*, 1996).

A recombinação gênica entre as estirpes virais ocorre facilmente devido ao seu genoma segmentado (OLIVEIRA Jr *et al.*, 2001).

O *Vírus influenza A* possui 17 subtipos da HA E 9 de NA. Esses subtipos distribuem-se de modo diferente entre as espécies. Admitia-se que apenas o H1, H2 e H3 acometiam humanos, mas outros subtipos já foram isolados em humanos, o H5, no sudoeste da Ásia, o H7 e H9 na Europa (BARROS *et al.*, 2004).

## 2.3. Epizootiologia

O vírus da influenza aviária já foi diagnosticado em cetáceos (HINSHAW *et al.*, 1986), suínos (CAMPITELLI *et al.*, 1997), cavalos (NEWTON *et al.*, 1999), humanos (SUBBARAO e KATZ, 2000) e caninos (SONGSEEM *et al.*, 2006).

Mancini *et al.*, (2004) demonstraram que animais heterotérmicos (sapos e serpentes) apresentam receptores para o vírus influenza do tipo A de humano e equino

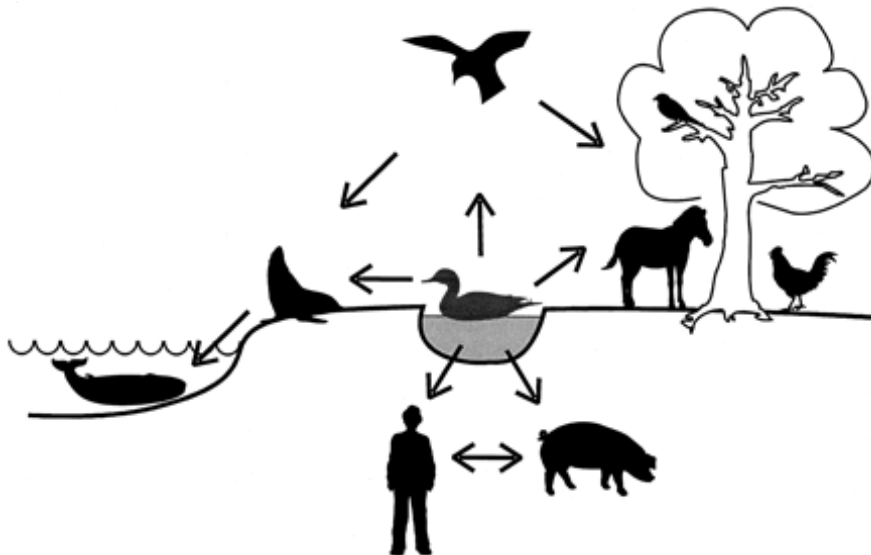
e do tipo B, podendo assim atuar como hospedeiros do vírus e ter susceptibilidade à infecção.

O vírus influenza A ocorre em aves, humanos, suínos, eqüinos e caninos, o tipo B ocorre apenas em humanos e o tipo C em humanos e suínos. Os vírus influenza A são os que mais ocorrem no mundo inteiro.

As aves silvestres são os principais reservatórios do vírus influenza aviária, devido à característica assintomática nessas aves, sendo, portanto fonte primária de disseminação da doença (WEBSTER *et al.*, 1992 OLSEN *et al.*, 2006).

Os vírus influenza podem ser classificados também quanto a sua virulência, alta patogenicidade e baixa patogenicidade (HORIMOTO e KAWAOKA, 2001).

Em silvestre é mais comum o isolamento de vírus de baixa patogenicidade (ALEXANDER, 2007), porém não se deve dar pouca relevância a esse fato, já que o vírus sofre muita recombinação gênica, podendo assim surgir novas estirpes. Essa baixa virulência em aves silvestres favorece a preservação do vírus na natureza por vários anos, tendo, portanto uma reincidência da mesma estirpe que pode infectar várias espécies animais (FIELDS *et al.*, 1996), como mostra a figura 2.



**Figura 2.** Disseminação do vírus influenza interespecies.  
 FONTE: Horimoto e Kawaoka, 2001.

Os vírus influenza de alta patogenicidade raramente são isolados em aves silvestres (SWAYNE e SUAREZ, 2000), ao contrário das aves domésticas, que são vítimas freqüentes dos subtipos H5 e H7 (ALEXANDER, 2000; OLSEN *et al.*, 2006).

A ocorrência do subtipo do vírus influenza varia entre as aves, em marrecos predominam os subtipos H3, H4, e H6; em gaivotas e aves costeiras predominam os subtipos H9 e H13 (SENNE *et al.*, 2006).

A transmissão entre aves ocorre através de secreções respiratórias e fezes, direta ou indiretamente. As aves silvestres são fontes de contaminação de grande importância, principalmente para as granjas de aves, pois é muito difícil afastar as aves de um local onde existe grande quantidade de alimento.

Em 1918-1920, 1957-1960 e 1968-1972 ocorreram grandes pandemias de influenza, onde as estirpes virais isoladas tinham genoma recombinante de aves e humanos. O mundo teme uma nova pandemia, visto que, em Hong Kong em 1997, as estirpes H5N1 e H9N2 levaram a óbito seis pessoas e foi comprovada a transmissão direta de vírus influenza aviário para humanos (ZHOU *et al.*, 1999a; HORIMOTO e KAWAOKA, 2001).

Os suínos participam como hospedeiros intermediários para recombinação genética entre aves e humanos (WEBSTER *et al.*, 1992)

A recombinação entre influenza de aves, suínos e humanos, foi demonstrada em plantéis de suínos na Carolina do Norte, Texas, Minnesota e Iowa em 1998. O isolado da Carolina do Norte resultou da combinação entre H3N2 de humanos e H1N1 de suínos e os demais de H3N2 de humanos, H1N1 de suínos e genes de vírus de aves (ZHOU *et al.*, 1999b).

Somente o tipo A causa infecção natural em aves, os isolados de alta virulência para aves domésticas chegam a causar mortalidade de 100% nas aves. Esses vírus influenza de alta patogenicidade geralmente são dos subtipos H5 e H7 (ALEXANDER, 2000; ALEXANDER, 2007).



## 2.4. Manifestações clínicas

Nas aves silvestres, a influenza geralmente é subclínica, mas em alguns casos a doença envolve o sistema nervoso central com mortalidade alta em uma semana (MARTINS, 2001). As aves também podem desenvolver edema das faces, fraqueza e morte (NAEEM *et al.*, 1999).

Em perus o índice de mortalidade é altíssimo, pois eles são sensíveis a doenças que envolvem o trato respiratório e geralmente a transmissão está envolvida com a presença de aves migratórias nos plantéis de criação (MARTINS, 2001).

Os vírus de baixa patogenicidade levam a uma infecção do trato respiratório e/ou intestinal. Os de alta patogenicidade causam infecção sistêmica em vários órgãos sendo responsáveis por alto índice de mortalidade (LEBARBENCHON *et al.*, 2007).

Na Tailândia, um cão se contaminou com o vírus H5N1 depois de ingerir a carcaça de um pato infectado e após cinco dias apresentou febre alta, dificuldade respiratória, letargia e foi a óbito. A necropsia revelou quadro de pneumonia severa e edema pulmonar (SONGSEEM *et al.*, 2006).

A influenza humana se caracteriza por doença respiratória aguda que pode durar poucos dias ou semanas. Em humanos a taxa de morbidade mais alta está entre as pessoas com menos de 20 anos, mas a taxa de mortalidade mais alta está entre as pessoas com mais de 65 anos (FIELDS *et al.*, 1996). Uma estirpe do vírus influenza aviária A/Hong Kong/156/97 (H5N1) foi fatal em crianças, desenvolvendo faringite, tosse seca e febre (FOUCHIER *et al.*, 2004).

## 2.5. Diagnóstico

A influenza é uma doença de notificação obrigatória no Brasil e no mundo. O diagnóstico é feito por isolamento e identificação do vírus através de amostra de swab oral, retal e soro sanguíneo. O isolamento é feito através de inoculação em ovos

embrionados, teste de hemaglutinação e inibição da hemaglutinação. O diagnóstico também pode ser feito por PCR e ELISA.

A histopatologia não é um teste de diagnóstico para a influenza aviária, já que é um vírus que não causa efeito patognomônico. As técnicas histológicas que podem ser empregadas para o vírus influenza aviária estão baseados nas lesões histológicas que os vírus causam nas células e tecidos do animal infectado.

Keawcharoen *et al.*, (2004) avaliaram a histopatologia de órgãos de dois tigres (*Panthera tigris*) e dois leopardos (*Panthera pardus*) infectados pelo vírus A (H5N1). A histopatologia com coloração de H&E revelou lesões pulmonares caracterizadas por perda do epitélio alveolar e bronquiolar, engrossamento da parede do alvéolo, edema do lúmen alveolar com presença de fibrina, eritrócitos, neutrófilos e macrófagos.

A histopatologia de tecidos de patos e gaivotas revelou necrose neuronal difusa no cérebro e cerebelo, pancreatite necrosante, adrenalite e necrose multifocal no miocárdio (BROWN *et al*, 2006).

Perkins e Swayne, (2001) observaram a patologia da influenza H5N1 em sete espécies de Gallinaceous. Os sinais clínicos mais freqüentes foram diarréia mucoide, sintomas neurológicos e apatia. As lesões macroscópicas mais encontradas foram esplenomegalia, edema e congestão pulmonar, hemorragias nos linfonodos entéricos, hemorragia nas superfícies serosas e hemorragia nos músculos.

## **2.6. Prevenção e controle**

O Ministério da Agricultura, com colaboração de entidades públicas e particulares mantém um programa de monitoração permanente das aves nacionais e um controle rígido das aves importadas.

O controle para a influenza aviária deve ser rígido, não apenas para estirpes de alta virulência, mas também para as de baixa virulência. Pois uma estirpe de baixa

virulência pode sofrer mutações e recombinação dando origem a uma estirpe de alta patogenicidade (DeJONG *et al.*, 2000).

As aves silvestres devem ser constantemente monitoradas, pois apesar de apresentarem vírus de baixa patogenicidade, estes infectam aves domésticas, cetáceos, suínos, cavalos e humanos, podendo evoluir para estirpes de alta patogenicidade devido a mutações e recombinações gênicas (SWAYNE e SUAREZ, 2000).

## **2.7. Importância econômica e sanitária**

Meltzer *et al.*, (1999) estimaram nos EUA, entre 89.000 a 207.000 óbitos humanos, 314.000 a 734.000 hospitalizações e 18 a 42 milhões de consultas ambulatoriais. Essa estimativa mostra o impacto econômico da influenza, os gastos que um país tem com internações e consultas quando o período de ocorrência da doença é elevadíssimo e que em pandemias o impacto econômico é bastante considerável.

No Brasil, Brondi *et al.*, (2001) estimaram um aumento de 235.000 internações humanas por influenza, em uma situação não pandêmica, no período de 1995-2001.

A estirpe A (H5N1) acarretou o sacrifício de aproximadamente um milhão de aves domésticas em Hong Kong no ano de 1997; levou a morte de seis mil galinhas de uma única fazenda na Coréia do Sul, em dezembro de 2003 e a morte de 40 mil galinhas e no abate de mais 30 mil aves no Sul do Vietnã no início do ano de 2007 (WHO, 2004).

A doença causada pelo vírus de alta patogenicidade é restrita a pequenas áreas geográficas, mas causam altas taxas de mortalidade em aves domésticas e grandes perdas econômicas (LEBARBENCHON *et al.*, 2007).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Animais e captura

Foram coletadas amostras de fezes de aves migratórias e residentes costeiras totalizando 342 aves. Nas capturas foram utilizadas 14 redes (12 m X 2,5 m) tipo *mist-nets* perfazendo um total de 168 metros de rede colocadas em linha reta (Figura 3). A cada duas horas a equipe fazia a vistoria nas redes e retiravam as aves capturadas colocando-as individualmente em sacos de tecido 100% algodão onde eram levadas para o ônibus da UENF, que funcionou como base no campo (Figura 4). Na base as aves foram colocadas em box individuais (Figura 5), e em seguida manipuladas para realização da biometria, anilhamento e coleta de material fecal. Logo após esses procedimentos as aves foram soltas, minimizando assim o estresse da apreensão. A biometria consiste em dados das aves como peso, medida do comprimento total, comprimento de bico, comprimento de cauda, envergadura de asa e observação das mudas das penas e foram feitas de acordo com as normas do Centro Nacional de Pesquisa para Conservação das Aves Silvestres - CEMAVE.



**Figura 3:** Redes ornitológicas armadas para capturas de aves no Mangue Carapeba – Campos dos Goytacazes – RJ (2007).



**Figura 4.** Base das saídas a campo, Mangue Carapeba, Campos dos Goytacazes – RJ (2007).



**Figura 5.** Box individuais para conter as aves. Mangue Carapeba , Campos dos Goytacazes - RJ (2007).

Das 342 aves capturadas, apenas 27 não foram capturadas em rede ornitológica. Destas, 14 foram *Spheniscus magellanicus*, 5 *Crotophaga ani*, 01 *Procellaria aequinoctialis*, 03 *Anas bouchas*, 02 *Anas bahamensis* e 02 *Dendrocygna viduata*. Os 14 pingüins (*Spheniscus magellanicus*) chegaram debilitados no litoral do Espírito Santo e estavam em tratamento na Organização Consciência Ambiental – Instituto ORCA, os *Crotophaga ani* estavam debilitados e foram encontrados no campus da UENF e a *Procellaria aequinoctialis* apareceu debilitada na praia de Atafona – São João da Barra e foi capturada e entregue a nós por agentes do corpo de bombeiros. Já os marrecos das espécies *Anas bouchas*, *Anas bahamensis* e *Dendrocygna viduata* foram capturados com puçá em uma propriedade particular no município de São Fidélis.

### **3.2. Local e período de capturas**

As coletas foram realizadas nos principais pontos de repouso e alimentação das aves que são: Lagoa de Iquipari (21°44'14.37"S/41°1'29.80"O), e Pontal de Atafona (21°37'2.80"S/41°0'48.16"O), localizadas no município São João da Barra; Lagoa do Açú (21°55'11.02"S/40°58'55.70"O) e Mangue Carapeba (22°4'57.59"S/41°7'20.25"O), localizadas no município de Campos dos Goytacazes, local onde foi realizada a maior parte das coletas. As capturas foram realizadas entre os meses de setembro a maio, período em que as aves migratórias chegam nesta região, sendo realizadas em sua maioria no período noturno (maior rendimento na captura), das 18:00h às 06:00h. Por essa razão, também foi levada em consideração a fase da lua, preferindo-se lua nova, por caracterizar noites mais escuras, dificultando a visualização das redes pelas aves.

### **3.3. Coleta e processamento das fezes**

As amostras de fezes coletadas foram colocadas em microtubo com tampão salina fosfato (PBS) pH 7,2 com 20% glicerol para preservação do material, numeradas, acondicionadas em gelo e remetidas ao Laboratório de Sanidade Animal – LSA/CCTA/UENF, onde foram guardadas sob refrigeração a -20 °C até o processamento. No laboratório as fezes foram novamente diluídas em PBS pH 7.2, centrifugadas a 600 x g durante 15 minutos a 4 °C e coletado o sobrenadante. O sobrenadante foi tratado com penicilina 500 UI e fungisona 5mg/mL para serem inoculadas via cavidade alantóide, em ovos embrionados.

### **3.4. Isolamento e identificação de vírus**

#### **3.4.1. Inoculação em ovos embrionados**

As amostras de fezes previamente processadas foram inoculadas (0,2mL) via cavidade alantóide, em ovos embrionados, com 9 a 11 dias de incubação. Após as inoculações, os ovos foram incubados em estufa a 33 °C por 72 horas. Em seguida, os ovos inoculados foram resfriados a 4 °C, a fim de promover uma vasoconstricção, evitando assim o rompimento de vasos e contaminação do líquido alantóico com sangue. O líquido alantóico coletado foi fracionado em duas amostras, uma para realização do teste de hemaglutinação (HA) e outra para extração de RNA (MANUGUERRA & HANNOUN, 1999).

Os líquidos alantóicos coletados que foram negativos no teste de HA, foram inoculados em ovos embrionados, o que se chama de “passagem cega” e submetidos novamente ao teste de HA para confirmação (BRASIL-MAARA, 1994).

Os ovos embrionados utilizados foram provenientes da Granja Tolomei e estavam livres de anticorpos virais.

#### **3.4.2. Teste de hemaglutinação**

Para verificar a presença de atividade hemaglutinante no líquido alantóico foi realizado o teste de hemaglutinação. Utilizando microplacas com 96 orifícios com fundo em “U”, adicionou-se 50µL do líquido alantóico em cada poço e diluiu-se em PBS pH 7,2, resultando em diluições 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64 depois adicionou-se 50µL de hemácias de galinha a 1% (MANUGUERRA & HANNOUM, 1999). As hemácias utilizadas foram lavadas em PBS e diluídas até obter uma concentração a 1%.

As microplacas foram deixadas em temperatura ambiente ( $\pm$  25 °C) e após 60



minutos foram feitas as leituras. Foram consideradas positivas as amostras que formaram rede, indicando a ligação da hemácia ao vírus presente na amostra.

O teste de HA foi realizado em duplicata para cada amostra e em todas as microplacas realizou-se o controle das hemácias, utilizando apenas PBS pH 7,2 e hemácia 1%. Como controle positivo foram utilizados amostras de vírus influenza H3N2: A/England/42/72 e o H3N8: A/Equine/Newarket/1/93 e 2/93.

### **3.4.3. Extração e purificação do RNA viral**

O RNA foi purificado a partir do líquido alantóico de ovos embrionados inoculados que apresentaram resultado HA positivo da mesma forma que o líquido alantóico de ovos inoculados com vírus padrão subtipo H3N2: A/England/42/72 e o H3N8: A/Equine / New Market/ 1/93 e 2/93 utilizado como controle positivo nas reações de RT-PCR. Todas as extrações foram realizadas através do kit QIAmp<sup>®</sup> Viral RNA Mini Kit (QIAGEN) obedecendo as recomendações do laboratório fabricante.

### **3.4.4. Amplificação molecular (RT-PCR)**

O protocolo utilizado foi o mesmo adotado como rotina no Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo da FIOCRUZ desenvolvido por Ellis e Zambon (2001).

Após a extração o RNA viral foi submetido à transcriptase reversa e o produto dessa reação (DNA complementar) foi adicionado aos oligonucleotídeos complementares, dideoxinucleotídeos, ATP e Taq polimerase para amplificação em termociclador utilizando o seguinte programa: 37 °C/60 minutos; 95 °C/ 5 minutos, mantendo ao final a 10 °C. Em todas as reações foram utilizadas como controle positivo amostra padrão (H3N2: A/England/42/72 e o H3N8: A/Equine / New Market/ 1/93 e 2/93), como controle negativo água livre de DNA e RNA. Caso não fossem

imediatamente utilizados os produtos (cDNA) foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

Como região alvo para a identificação viral, foi definida a seqüência codificadora do gene da matriz viral do vírus influenza A. Os oligonucleotídeos utilizados foram: *primers* externos AMP71F 5'-CCGTCA GGCCCCCTCAAAGC-3'; AMP831R 5'-AGGCGATCAAGAATCCACAA-3'; *primers* internos: AMP227F 5'-GTGCCAGTGAGCGAGGAC-3'; AMP622R 5'-ATCTCCATGGCCTCTGCT-3'.

Na primeira PCR o programa foi de  $94^{\circ}\text{C}/2$  minutos; seguido de 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}/1$  minuto;  $68^{\circ}\text{C}/1$  minuto e trinta segundos; e  $72^{\circ}\text{C}/5$  minutos mantendo ao final a  $15^{\circ}\text{C}$ . Na segunda PCR o programa foi de  $94^{\circ}\text{C}/2$  minutos; seguido de 30 ciclos de  $94^{\circ}\text{C}/1$  minuto;  $60^{\circ}\text{C}/1$  minuto e trinta segundos; e  $72^{\circ}\text{C}/5$  minutos, mantendo ao final a  $15^{\circ}\text{C}$ . Para visualização dos produtos amplificados, o DNA complementar ao RNA viral foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5% em Tris-Borato-EDTA (TBE), corado com brometo de etídeo. O tamanho da banda esperada foi de 413pb.

Em todas as reações foram colocados paralelamente no gel os controles positivos (H3N2: A/England/42/72 e o H3N8: A/Equine / New Market/ 1/93 e 2/93) bem como o *lader* (1 Kb Plus DNA Ladder Cat. No. 10787-018 – Invitrogen).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Animais

Foram capturadas 342 aves de 23 espécies diferentes, sendo 11 residentes e 12 migratórias (Figura 6 e 7).



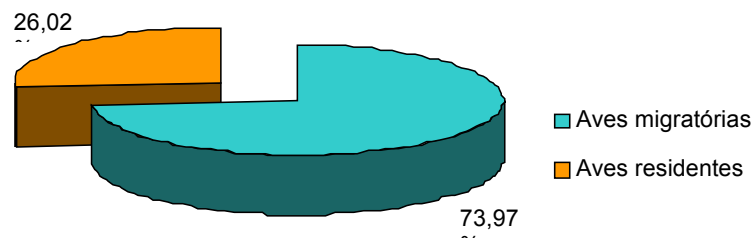
**Figura 6:** *Arenaria interpres*, capturada no Mangue Carapeba, Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.



**Figura 7:** *Charadrius collaris*, capturada no Mangue Carapeba, Campos dos Goytacazes – RJ, 2007.

O número de aves migratórias capturadas, 253, (73,97%) foi maior que o número de aves residentes, 89, (26,02) como mostra o gráfico 1, concordando com os dados

encontrados por Araújo *et al*, (2004b) que capturaram 172 aves silvestres, 111 migratórias e 61 residentes no Parque Nacional da Lagoa dos Peixes – RS e por Azevedo Junior *et al*, (2001) que capturaram 2577 aves migratórias e 19 residentes na Coroa do Avião – PE em dez anos de pesquisa.



**Gráfico 1:** Porcentagem de aves migratórias e residentes capturadas na Região Norte Fluminense do Estado do Rio de Janeiro, 2004 a 2007.

As aves migratórias estão distribuídas entre as espécies *Charadrius semipalmatus* (113), *Calidris fuscicollis* (32), *Arenaria interpres* (32), *Tringa flavipes* (28), *Actitis macularia* (15), *Spheniscus magellanicus* (14), *Numenius phaeopus* (06), *Tringa melanoleuca* (05), *Anas boucha* (3), *Chordeiles minor* (01), *Diomedea chlororhynchos* (01), *Sterna hirundo* (01), *Pluvialis squatarola* (01), *Procellaria aequinoctialis* (01), totalizando 253 aves (Tabela 1).

As aves residentes estão distribuídas entre as espécies *Charadrius collaris* (73), *Crotophaga ani* (05), *Anas bahamensis* (03), *Butorides striatus* (02), *Dendrocygna viduata* (2), *Nycticryphes semicollaris* (01), *Tito alba* (01), *Speotyto cunicularia* (01) e *Vanellus chilensis*, (01) totalizando 89 aves.

Das 342 aves capturadas, sete viviam em cativeiro na cidade de São Fidelis – RJ, três *Anas bouchas*, duas *Anas bahamensis* e duas *Dendrocygna viduatas*.

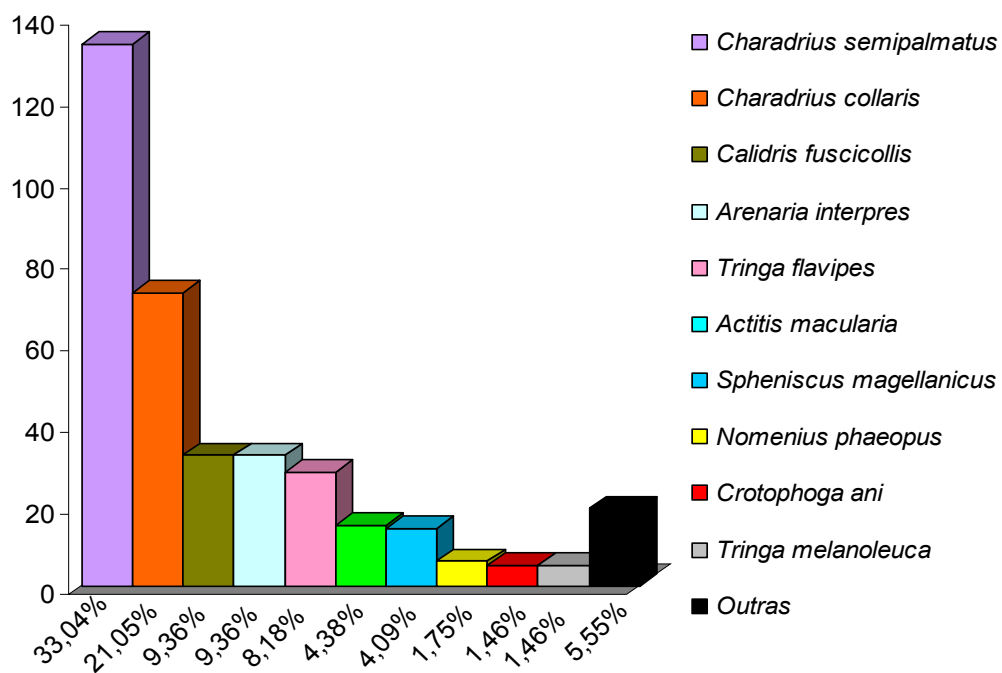
**Tabela 1:** Número de aves capturadas nos anos de 2004 a 2007, agrupadas por espécies e *status*.

<b>Espécie</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Status</b>
<i>Charadrius semipalmatus</i>	113	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Charadrius collaris</i>	73	Residente
<i>Arenaria interpres</i>	32	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Calidris fuscicollis</i>	32	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Tringa flavipes</i>	28	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Actitis macularia</i>	15	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Spheniscus magellanicus*</i>	14	Migrante do Hemisfério Sul
<i>Nomenius phaeopus</i>	06	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Crotophaga ani*</i>	05	Residente
<i>Tringa melanoleuca</i>	05	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Anas bouchas**</i>	03	Exótica do Hemisfério Norte
<i>Anas bahamensis**</i>	03	Residente
<i>Butorides striatus</i>	02	Residente
<i>Dendrocygna viduata**</i>	02	Residente
<i>Vanellus chilensis</i>	01	Residente
<i>Nycticryphes semicollaris</i>	01	Residente
<i>Tito alba</i>	01	Residente
<i>Speotyto cunicularia</i>	01	Residente
<i>Pluvialis squatarola</i>	01	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Diomedea chlororhynchos</i>	01	Migrante do Hemisfério Sul
<i>Chordeiles minor</i>	01	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Sterna hirundo</i>	01	Migrante do Hemisfério Norte
<i>Procellaria aequinoctialis*</i>	01	Migrante do Hemisfério Sul
<b>TOTAL</b>	<b>342</b>	<b>89 residentes / 253 migratórias</b>

\*Aves encontradas debilitadas não capturadas em rede.

\*\* Aves de cativeiro.

O gráfico 2 apresenta a frequência das espécies capturadas neste trabalho. *Charadrius semipalmatus* foi a que mais ocorreu em um total de 33,04%, seguido pelas espécies *Charadrius collaris* 21,34%, *Calidris fuscicollis* 9,35%, *Arenaria interpres* 9,35% *Tringa flavipes* 8,18%, *Actitis macularia* 4,38%, *Spheniscus magellanicus* 4,09%, *Numenius phaeopus* 1,75%, *Crotophaga ani* 1,46%, *Tringa melanoleuca* 1,46 e 5,55% são de outras espécies que foram encontradas em número igual ou menor que três.



**Gráfico 2:** Porcentagem das espécies capturadas na Região Norte Fluminense, nos anos de 2004 a 2007.

Dados de captura de aves observados na literatura demonstram uma grande variação da quantidade e diversidade de espécies encontradas no Brasil, com 73 espécies catalogadas (VOOREM *et al*, 1999). Neste trabalho a espécie que ocorreu em maior quantidade, *Charadrius semipalmatus* (33,04%, 113/342), não foi a mesma encontrada por outros autores como Azevedo Júnior *et al*, (2001), na Coroa do Avião – PE, onde prevaleceu a espécie *Calidris pusilla* (71,30%, 1851/2596); Araújo *et al*, 2003, no Parque Nacional da Lagoa do Peixe – RS, onde prevaleceu *Arenaria interpres* (51%, 342/556); Araújo *et al*, (2004a), em Galinhos – RN, onde prevaleceu a espécie *Calidris*

*pusilla* (76,23%) e por Araújo *et al*, (2004b) no Parque Nacional da Lagoa do Peixe – RS, onde prevaleceu a espécie *Sterna hirundo* (34,9%, 60/172).

As taxas de *Charadrius semipalmatus* encontradas por Azevedo Júnior *et al*, 2001, Araújo *et al*, (2003), Araújo *et al*, (2004a) e Araújo *et al*, 2004b foram de 8,36% (217/2596); 0,18% (1/556); 1,69% (12/711) e 1,74% (3/172), respectivamente. Pode-se observar que em nenhum desses trabalhos, diferentemente deste estudo, prevaleceu a espécie *Charadrius semipalmatus*. Essa observação provavelmente pode estar relacionada a algumas características dos sítios de invernada onde foram realizados os trabalhos de captura, que poderiam favorecer uma maior frequência de determinada espécie em detrimento de outra.

#### 4.2. Análise das amostras

Das 342 amostras de fezes inoculadas em ovos embrionados, 39 (11,4%) foram positivas no teste de hemaglutinação. Dessas, 12 (30,1%) foram da espécie *Arenaria interpres*, 07 (17,9%) *Charadrius semipalmatus*, 06 (15,4%) *Actitis macularia*, 04 (10,2%) *Charadrius collaris*, 03 (7,7%) *Calidris fuscicollis*, 02 (5,1%) *Numenius phaeopus*, 01 (2,5%) *Crotophaga ani*, 01 (2,5%) *Anas bahamensis*, 01 (2,5%) *Dendrocygna viduata*, 01 (2,5%) *Tringa melanoleuca* e 01 (2,5%) *Tito Alba* (Tabela 2).

Os títulos hemaglutinantes encontrados variaram de 1:2 a 1:64, esses resultados estão demonstrados na tabela 2.

**Tabela 2:** Espécies de aves positivas no teste de hemaglutinação com respectivos títulos hemaglutinantes e *status*.

<b>Espécies</b>	<b>Número da amostra</b>	<b>Título do HA</b>	<b>Status</b>
<i>Arenaria interpres</i>	169	1:64	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	200	1:2	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	207	1:8	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	209	1:8	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	214	1:8	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	218	1:2	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	219	1:2	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	221	1:8	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	222	1:8	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	225	1:8	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	226	1:8	Migrante Norte
<i>Arenaria interpres</i>	227	1:8	Migrante Norte
<i>Charadrius semipalmatus</i>	177	1:8	Migrante Norte
<i>Charadrius semipalmatus</i>	187	1:16	Migrante Norte
<i>Charadrius semipalmatus</i>	243	1:8	Migrante Norte
<i>Charadrius semipalmatus</i>	263	1:8	Migrante Norte
<i>Charadrius semipalmatus</i>	284	1:4	Migrante Norte
<i>Charadrius semipalmatus</i>	297	1:64	Migrante Norte
<i>Charadrius semipalmatus</i>	339	1:8	Migrante Norte
<i>Actitis macularia</i>	109	1:2	Migrante Norte
<i>Actitis macularia</i>	208	1:8	Migrante Norte
<i>Actitis macularia</i>	229	1:4	Migrante Norte
<i>Actitis macularia</i>	230	1:32	Migrante Norte
<i>Actitis macularia</i>	318	1:2	Migrante Norte
<i>Actitis macularia</i>	319	1:2	Migrante Norte
<i>Charadrius collaris</i>	197	1:8	Residente
<i>Charadrius collaris</i>	236	1:8	Residente
<i>Charadrius collaris</i>	268	1:8	Residente
<i>Charadrius collaris</i>	312	1:8	Residente
<i>Calidris fuscicolis</i>	108	1:4	Migrante Norte



<i>Calidris fuscicolis</i>	110	1:8	Migrante Norte
<i>Calidris fuscicolis</i>	329	1:4	Migrante Norte
<i>Nomenius phaeopus</i>	175	1:4	Migrante Norte
<i>Nomenius phaeopus</i>	215	1:8	Migrante Norte
<i>Crotophaga ani</i>	163	1:64	Residente
<i>Anas bahamensis</i>	193	1:16	Residente
<i>Dendrocygna viduata</i>	196	1:8	Residente
<i>Tringa melanoleuca</i>	202	1:2	Migrante Norte
<i>Tito alba</i>	287	1:8	Residente

As 39 amostras positivas no teste de HA foram analisadas por RT-PCR tendo como região alvo para amplificação o gene da matriz viral que possibilita a identificação de todos os subtipos de vírus influenza A. Após análises todas as amostras foram negativas.

Diante desses resultados começa-se a questionar qual agente, com exceção do vírus influenza, seria responsável pelos títulos HA encontrados, já que outros agentes virais como coronavírus, adenovírus aviário e paramixovírus e até mesmo agentes bacterianos poderiam ser responsáveis por esses resultados.

No Caribe, Douglas *et al*, (2007) analisaram 168 swabs de aves silvestres, encontrando 27 amostras positivas no teste de hemaglutinação e destas apenas duas foram detectados os vírus influenza (H4N3) na espécie *Anas discors* por RT-PCR. A hemaglutinação das outras 24 amostras foi atribuída a bactérias hemaglutinantes.

A hipótese de a hemaglutinação ter sido causada por bactérias no presente trabalho foi descartada, já que, os líquidos alantóicos positivos foram filtrados em membrana de 0,22 micras e depois novamente submetidos ao teste de HA confirmando os resultados positivos.

Em seguida, apesar de não fazer parte do objetivo deste trabalho, algumas amostras HA positivas foram enviadas à PESAGRO/Niterói-RJ para análise por RT-PCR para diagnóstico do vírus da doença de Newcastle e por Real TIME RT-PCR para o vírus do Oeste do Nilo, onde todas foram negativas.

De acordo com a literatura as taxas de isolamento do vírus influenza em aves silvestres variam muito de espécie para espécie e até mesmo dentro de uma mesma espécie em diferentes sítios de nidificação ou invernada. A ordem Anseriformes é a que apresenta uma maior taxa de isolamento do vírus Influenza A. Em um trabalho de revisão, Stallknecht *et al*, (1988) citado por Douglas *et al*, (2007) observaram uma diferença nas taxa de isolamento do vírus influenza entre as ordens Anseriformes, Passeriformes e Charadriiformes, encontrando 15,2%, 2,9% e 2,2%, respectivamente.

Wallensten *et al*, (2004), na Suíça encontraram uma prevalência de 12% em Anseriformes, mais especificamente em *Anas platyrhynchos*.

Lei *et al*, (2007) em abril de 2006 encontraram uma taxa de isolamento do H5N1 de 3,22% (3/93) em Anseriformes (um *Anser indicus* e dois *Cygnus cygnus*) no Lago de Quingai na China, mesmo tendo ocorrido um surto em maio de 2005, onde o H5N1 matou mais que 6000 aves migratórias.

No Sul da França, Lebarbenchon *et al*, (2007) encontraram uma taxa de 1,8% (24/1345) em Anseriformes infectados com o vírus influenza, mas nenhum com H5N1.

Hurt *et al*, (2006), na Austrália, encontraram uma taxa de 5,78% analisando 173 amostras e apenas 10 foram positivas, cinco *Calidris acuminata* (H11N9) e cinco *Calidris ruficollis* (H4N8).

Kraus *et al*, (2004) fizeram um levantamento no período de 1976 a 2001 e observaram uma taxa de isolamento do vírus influenza de 22,2% (2989/13466) em anseriformes no Canadá e no período de 1985 a 2000, uma taxa de isolamento do vírus de 14,2% (605/4266) em Charadriiformes no Leste dos EUA.

Avaliando os dados encontrados em cinco anos, de 2001 a 2006, Kraus *et al*, (2007) observaram uma taxa de isolamento do vírus influenza de 16,6% em Anseriformes no Canadá e uma taxa de 5,8% em Charadriiformes nos EUA. O número de amostras coletadas de Anseriformes foi bem menor que o de Charadriiformes 590 e 1970 respectivamente, mesmo assim a taxa de isolamento do vírus influenza para Anseriformes foi maior.

Winker *et al*, (2007) fizeram um levantamento de 1998 a 2004, em um total de 8254 aves na América do Norte e observaram uma taxa de isolamento de 0,061% (5/8254), onde todos os isolamentos foram de Anseriformes.

De Marco *et al*, (2004), na Itália, também observaram diferentes taxas de isolamento comparando Anseriformes e Gruiformes e encontraram 3,8% e 1,2% respectivamente.

Stanislawek *et al*, (2002), na Nova Zelândia, encontraram uma taxa de isolamento de 1,87% (6/321) em Anseriformes.

Terregino *et al*, (2007) encontraram uma taxa de isolamento de 1,2% (48/4083) em Anseriformes e 0,02% (1/4083) em Charadriiformes (*Gallinago gallinago*).

Douglas *et al*, (2007), no Caribe, analisaram 40 *swabs* cloacal de Anseriformes e 124 de Charadriiformes e encontraram uma taxa de isolamento do vírus influenza de 1,19% (2/168), sendo essas duas amostras em Anseriformes (*Anas discors*).

No Brasil, Araújo *et al*, (2004b), no Parque Nacional da Lagoa do Peixe – RS isolaram o H4 e H2 de *pool* de aves migratórias não sendo possível determinar qual espécie envolvida, pois, os autores fizeram análise a partir de *pools* de fezes de diferentes espécies.

Em Galinhos – RN, Araújo *et al*, (2004a) examinaram 388 amostras fecais de aves, divididas em 22 *pools* e encontraram 13 *pools* positivo para influenza para o subtipo H3, incluindo aves migratórias e residentes, não sendo possível, portanto determinar a taxa de isolamento por espécie.

No Estado de São Paulo, Soares *et al*, (2005) isolaram o vírus influenza em três passeriformes, dois da espécie *Elaenia mesoleuca* e um *Sporophila caerulescens*.

Em um estudo realizado no Rio de Janeiro, Oliveira Júnior *et al*, (2001) isolaram o H1N1 e H3N2 em aves silvestres e domésticas de cativeiro encontrando uma prevalência de 17,89% (22/123) e 37,25% (38/102), respectivamente.

Como se pode observar, as taxas de isolamento do vírus influenza são variáveis nas diferentes espécies. De uma forma geral, as taxas encontradas em Anseriformes são maiores que em Charadriiformes. No presente trabalho foi capturado apenas um Anseriforme de vida livre e sete de cativeiro o que pode ter diminuído as chances de isolamento.

A ausência do vírus influenza nas amostras não significa que no Norte do Estado do Rio de Janeiro não esteja circulando vírus influenza entre as aves migratórias e residentes, e sim que nas amostras coletadas não foram isolados os vírus.

Como se sabe, o Brasil recebe várias espécies de aves que migram do Norte e do Sul do Continente Americano através de três importantes rotas, a Rota Americana do Mississippi, a Rota Americana do Pacífico e a Rota Americana do Atlântico. Apesar dessas rotas não passarem por locais onde foram isolados os vírus influenza A de alta patogenicidade, elas se cruzam com rotas como a Rota do leste Asiático e a Rota do Atlântico Leste, que passam por essas regiões (NUNES, *et al* 2006), demonstrando assim a necessidade de ser realizado um monitoramento constante das aves migratórias costeiras.

## 5. CONCLUSÃO

- A região Norte Fluminense, devido às suas características, possui excelentes sítios de invernada para as aves migratórias oriundas da América do Norte sendo, dessa forma, um bom lugar para o monitoramento de espécies como a *Charadrius semipalmatus*;
- O número de aves migratórias capturadas, 253, (73,97%) foi maior que o número de aves residentes, 89 (26,02), no período de novembro de 2004 a fevereiro de 2007;
- A espécie mais capturada foi *Charadrius semipalmatus* 33,04% (113/342);
- Não foi encontrado nenhum subtipo de Vírus Influenza A em amostras fecais de aves migratórias e residentes capturadas neste trabalho.

## 6. SUGESTÃO

- Para elaborar um plano de ação nacional para combater e controlar surtos de vírus influenza são necessários estudos constantes da epidemiologia do vírus, o que demonstra a importância do monitoramento constante das aves migratórias que chegam ao Brasil todos os anos no período de invernada;
- Aumentar o número amostral no próximo período de invernada;
- Capturar um maior número de Anatídeos de vida livre.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ARAÚJO, F.A.A.; WADA, M.Y.; SILVA, E.V.; CAVALCANTE, MAGALHÃES, V.S.; ANDRADE FILHO, G.V., RODRIGUES, S.G., MARTINS, L.C., FEDRIZZI, C.E., SCHERER, A., MOHR, L.V., ALMEIDA, M.A.B., BUNA, B.S., CSOTA, L.R.º, SCHERER, S.B., VIANNA, R.S., GATTAS, V.L. Primeiro inquérito sorológico em aves migratórias e nativas do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus do Nilo ocidental. **SVS – Boletim eletrônico epidemiológico**, ano 03, n. 01, 2003.

ARAÚJO, F.A.A.; VIANNA, R.S.T.; WADA, M.Y.; SILVA, E.V.; DORETTO, L.; CAVALCANTE, G.C.; AZEVEDO JUNIOR, S.M.; MAGALHÃES, V.S.; GOMES, J.L.; QUEIROZ, P.V.S.; LARRAZÁBAL, M.E.; MARTINS, L.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Inquérito sorológico em aves migratórias e residentes de Galinhos/RN para detecção do vírus da febre do Nilo ocidental e outros vírus. **SVS – Boletim eletrônico epidemiológico**, ano 04, n. 02, 2004a.

ARAÚJO, F.A.A.; VIANNA, R.S.T.; ANDRADE FILHO, G.V.; MELHADO, D.L.; TODESCHINI, B.; CAVALCANTE, G.C.; FEDRIZZI, C.E.; MAGALHÃES, V.S.; SCHERER, A.; ALMEIDA, M.A.B.A.; PORTELLA, A.S.; SANTOS, E.; SCHERER, S.B.; DORETTO, L.; MARTINS, L.C.; RODRIGUES, S.G.; VASCONCELOS, P.F.C. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus da febre do Nilo ocidental e outros vírus. **SVS – Boletim eletrônico epidemiológico**, ano 04, n. 05, 2004b.

AZEVEDO JR, S.M., DIAS, M.M., LARRAZÁBAL, M.E., TELINO JR, W.R., NEVES, R.M.L., FERNANDES, C.J.G. Recaptura de aves migratórias no litoral de Pernambuco, Brasil. **Ararajuba**, v. 9 (1), p. 33-42, 2001.

BARROS, F.R.; DAUFENBACH, L.D.; VICENTE, M.G.; SOARES, M.S.; SIQUEIRA, M.; CARMO, E.G. O desafio da influenza: epidemiologia e organização da vigilância no Brasil. **SVS – Boletim eletrônico epidemiológico**, ano 04, n. 01, p. 1-5, 2004.

BRASIL-MAARA (1994) Programa Nacional de Sanidade Avícola. Atos Legais, p.83.

BRENTANO, L. Influenza (gripe aviária) – epidemiologia da doença. In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA, Santa Catarina, p.154-160, 2006.

BRONDI, L.M.G., RAMALHO, W.M., BANKS, M.I.F., GOUVEIA, N.C., BARBOSA Jr, J. 2001. Excesso de internações hospitalares em indivíduos de 60 anos ou mais por influenza e causas atribuíveis, por região do Brasil – 1995-2001, [dados não publicados] Brasília, DF.

BROWN, J.D., STALLKNECHT, D.E., BECK, J.R., SUAREZ, D.L., SWAYNE, D.E. Susceptibility of North American Ducks and Gulls to H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. **Emerging Infection Disease**, v. 12, n.11, p. 1663-1670, 2006.

CAMPITELLI, L., DONATELLI, I., FONI, E., CASTRICCI, M.R., FABIANI, C., KAWAOKA, Y., KRAUSS, S., WEBSTER, R.G. Continued Evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. **Virology**, v. 232, n.2, p. 310-318, 1997.

CDC (2004a). Outbreaks of avian influenza A (H5N1) in Asia and interim recommendations for evaluation and reporting of suspected cases - United States, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, n. 5, p. 97-100.

CDC (2004b) Cases of influenza A (H5N1) – Thailand, 2004. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 53, n. 5, p. 100-103

CLAAS, E.C.C.J.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; VAN BEEK, R.; JONG, J.C.; RIMMELZWAAN, G.F.; SENNE, D.A.; KRAUSS, S.; SHORTRIDGE, K.F.; WEBSTER, R.G. Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic avian influenza virus. **The Lancet**, v. 351, n. 14, p. 472-477, 1998.

De JONG, J.C., RIMMELZWAAN, G.F., FOUCHIER, R.A., OSTERHAUS, A.D. Influenza virus: a master of metamorphosis. **Journal of Infection**, V. 40, p. 218-228, 2000.

De MARCO, M.A.; CAMPITELLI, L.; FONI, E.; RAFFINI, E.; BARIGAZZI, G.; DELOGU, M.; GUBERTI, V.; DI TRANI, L.; TOLLIS, M.; DONATELLI, I. **Veterinary Microbiology**, v. 98, p. 197-208, 2004.

DOUGLAS, K.O.; LAVOIE, M.C., KIM, L.M.; AFONSO, C.L.; SUAREZ, D. Isolation and genetic characterization of avian influenza viruses and a newcastle disease virus from wild birds in Barbados: 2003-2004. **Avian Diseases**, v.51, p.781-787, 2007.

ELLIS, J.S., ZAMBON, M.C. Combined PCR-Heteroduplex mobility assay for detection and differentiation of influenza A viruses from different animal species. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, p. 4097-4102, 2001.

FIELDS, B.N., KNIPE, B.M., and HOULEY, P.M., et al., (1996). In: chapter 5 *Paramyxovirus*, **Fundamental Virology** pp. 588 3<sup>a</sup> Edição.

FORLEO-NETO, E., HALKER, E., SANTOS, V.J., PAIVA, T.M., TONIOLO-NETO, J. Influenza. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 267-274, 2003.

FOUCHIER R.A, SCHNEEBERGER P.M., ROZENDAAL F.W., BROEKMAN J.M., KEMINK S.A, MUNSTER V., KUIKEN T., RIMMELZWAAN G.F., SCHUTTEN M., VAN DOORNUM G.J., KOCH G., BOSMAN A., KOOPMANS M., OSTERHAUS A.D. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, n. 5, p. 1356-61, 2004.

HIEN, T.T., LIEM, N.T., DUNG, N.T., SAN, L.T., MAI, P.P., CHAU, N.V.V., SUU, P.T., DONG, V.C., MAI, L.T.Q., THI, N.T., KHOA, D.B., PHAT, L.P., TRUONG, N.T., LONG, H.T., TUNG, C.V., GIANG, L.T., THO, N.D., NGA, L.H., TIEN, N.T.K., SAN, L.H., TUAN, L.V., DOLECEK, C., THANH, T.T., DE JONG, M., SCHULTSZ, C., CHENG, P., LIM, W., HORBY, P.; FARRAR, J. The World Health Organization International Avian Influenza investigative Avian Influenza A (H5N1) in 10 Patients in Vietnam. **N. Engl. J. Med.**, v. 350, p. 1179-1188, 2004.

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

HINSHAW, V.S., WEBSTER, R.G., EASTERDAY, B.C., BEAN JR, W.J. Replication of avian influenza A viruses in mammals. **Infection and Immunity**, v. 34, n. 2, p. 354-361, 1981.

HORIMOTO, T., KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. **Clinical Microbiology Review**, v. 14, p. 129-149, 2001.

HURT, A.C.; HANSBRO, P.M.; SELLECK, P.; OLSEN, B.; MINTON, C.; HAMPSON, A.W.; BARR, G.I. Isolation of avian influenza viruses from two different transhemispheric migratory shorebird species in Australia. **Archives of virology**, v. 151, p. 2301-2309, 2006.

KAWAOKA Y.; CHAMBERS, T.M., SLADEN, W,L.; WEBSTER, R.G. Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? **Virology**, v. 163, p. 247-250, 1988.

KEAWCHAROEN, J., ORAVEERAKUL, K., KUIKEN, T., FOUCHIER, R.A.M., AMONSIN, A., PAYUNGORN, S., NOPPORNANTH, S., WATTANODORN, S., THEAMBOONLERS, A., TANTILERTCHAROEN, R., PATTANARANGSAN, R., ARYA, N., RATANAKORN, P., OSTERHAUS, A.D.M.E., POOVORAWAN, Y. Avian Influenza H5N1 in Tigers and Leopards. **Emerging Infection Disease**, v. 10 (12), p. 2189-2191, 2004.

KOLATA, G. Gripe A história da pandemia de 1918, Rio de Janeiro: Record, 2002. 381 p.



KRAUSS, S.; WALKER, D.; PRYOR, S.P.; NILES, L.; CHENGHONG, L.; HINSHAW, V.S.; WEBSTER, R.G. Influenza A virus of migrating wild aquatic birds in North America. **Vector-borne and zoonotic diseases**, v. 4, n. 3, p. 177-189, 2004.

KRAUSS, S.; OBERT, C.A.; FRANKS, J.; WALKER, D.; JONES, K.; SEILER, P.; NILES, L.; PRYOR, S.P.; OBENAUER, J.C.; NAEVE, C.W.; WIDJAJA, L.; WEBBY, R.J.; WEBSTER, R.G. **Plos pathogens**, v. 3, n. 11, p. 1684-1693, 2007.

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

LANCIOTTI, R.S., J.T. ROCHRIG, V. DEUBEL, J. SMITH, M. PARKER, K. STEELE, K.E. VOLPE, M.B. CRABTREE, J.H. SCHERRET, R.A. HALL, J.S. MACKENZIE, C.B. CROPP, B. PANIGRABY, E. OSTLUND, B. SCHMITT, M. MALKINSON, C. BENET, J. WEISSMAN, N. KOMAR, H.M. SAVAGE, W. STONE, T. MCNAMARA, AND D. J. GUBLER. Origin of the West Nile virus I for an outbreak of encephalitis in the northeastern U.S. **Science**, v. 286, p. 2333-2337, 1999.

LEBARBENCHON, C.; WERF, S.; THOMAS, F.; AUBIN, J.T.; AZEBI, S.; CUVELIER, F.; JEANNIN, P.; ROCA, V.; CHANG, C.M.; KAYSER, Y.; BENJAMIN, R.; GUÉGAN, J.F.; RENAUD, F.; GAUTHIER-CLERC, M. Absence of detection of highly pathogenic H5N1 in migratory waterfowl in southern France in 2005-2006. **Infection, genetics and evolution**, v. 7, n. 5, p. 604-608, 2007.

LEI, F.; TANG, S.; ZHAO, D.; ZHANG, X.; KOU, Z.; LI, Y.; ZHANG, Z.; YIN, Z.; CHEN, S.; LI, S.; ZHANG, D.; YAN, B.; LI, T. Characterization of H5N1 influenza viruses isolated from migratory birds in Qinghai Province of China in 2006. **Avian diseases**, v. 51, p. 568-572, 2007.

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

LUNA, J.A.E., PEREIRA, L.E., SOUZA, R.P. Encefalite do Nilo Ocidental, nossa próxima epidemia? **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 12, n.1, p.7-19, 2003.

MANCINI, D.A.P., MENDONÇA, R.M.Z., CIANCIARULLO, A.M., KOBASHI, L.S., TRINDADE, H.G., FERNANDES, W., PINTO, J.R. Influenza em animais heterotérmicos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 2004.

MANUGUERRA, J.C., HANNOUN, C. Grippe et autres viroses respiratoires. **Collections des Laboratoires de Reference et d'expertise**, 1999.

MARTINS, N.R.S. Influenza aviária: uma revisão dos últimos dez anos. Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 2001.

MELTZER, M.I., COX, N.J., FUKUDA, K. The economic impact of pandemic influenza in the United States: Priorities for Intervention. **Emerging Infection Disease**, v. 5, n. 5, p. 61-73, 1999.

NAEEM, K., ULLAH, A., MANVELL, R.J., ALEXANDER, D.J. Avian influenza A subtype H9N2 in poultry in Pakistan. **Veterinary Record**, v. 145, n. 19, p. 560-563, 1999.

NEWTON, J.R., VERHEYEN, K., WOOD, J.L., YATES P.J., MUMFORD, J.A. Equine influenza in the United Kingdom in 1998. **Veterinary Record**, v. 145, n. 16, p. 449-452, 1999.

NOVELLI, R. 1997. Aves marinhas costeiras do Brasil, Porto Alegre, Ed. Cinco Continentes, 92p.

OIE. Update on highly pathogenic avian influenza in animals. 2008. Disponível em: <[http://www.oie.int/download/avian%20influenza/A\\_AI-Asia.htm](http://www.oie.int/download/avian%20influenza/A_AI-Asia.htm)>. Acesso em: 10 fev. 2008.

NUNES, M.F.C., LACERDA, R., ROOS, A., COSTA, J. Aves migratórias na Amazônia e a Gripe Aviária. **Centro Nacional de Pesquisa para conservação das Aves Silvestres - CEMAVE**, v.35, p. 1-16, 2006.

OLIVEIRA JUNIOR, J.G.; BELLUCI, M.S.P.; VIANNA, J.S.M., MAZUR, C.; ANDRADE, C.M.; FEDULLO, L.P.L.; PORTZ, C.; LOUREIRO, B.O. Avaliação soropidemiológica do vírus influenza em aves domésticas e silvestres no Estado do Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n.3, p.299-302, 2001.

OLSEN, C.W., CAREY, S., HINSHAW, L., KARASIN, A.I., Virologic and serologic surveillance for human, swine and avian influenza virus infections among pigs in the north-central United States. **Archives of virology**, v. 145, p. 1399-1419, 2000.

OLSEN, B.; MUNSTER, V.J.; WALLENSTEN, A.; WALDENSTRÖM, J.; OSTERHAUS, A.D.M.E.; FOUCHIER, R.A.M. Global patterns of influenza A virus in wild birds **Science**, v 312, p.384-387, 2006.

PAIVA, T.M., ISHIDA, M.A., GONÇALVES, M.G., BENEGA, M.A., SOUZA, M.C.O., CRUZ, A.S. Ocorrência do vírus da influenza similar à estirpe B/Hong Kong no Brasil, durante 2002. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 1, p. 51-52, 2003.

PERKINS, L.E.L., SWAYNE, D.E. Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) Avian Influenza Virus in Seven Gallinaceous Species. **Veterinary Pathology**, v. 38, p. 149-164, 2001.

SANTOS, D.E., CARDIAS, C.A., MELLO, W.A. Seroepidemiological survey for influenza virus in Belém, Pará, Brazil, 1992-1993. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 13, p. 119-125, 1997.

SENNE, D.A., SUAREZ, D.L., STALLNECHT, D.E., PEDERSEN, J.C., PANIGRAHY, B. Ecology and Epidemiology of Avian Influenza in North and South America. In Schudel A, Lombard M, editors. **Proceedings of the OIE/FAO International Conference on Avian Influenza. Developments in Biology**, v. 124, p. 37-44, 2006.

SOARES, P.B.M.; DEMÉTRIO, C.; SANFILIPPO, L.; KAWANOTO, A.H.N.; BRENTANO, L.; DURIGON, E.L. Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. **Journal of virological methods**, v.123, p.125-130, 2005.

SONGSEEM, T., AMONSIN, A., JAM-ON, R., SAE-HENG, N., PARIYOTHORN, N., PAYUNGPORN, S., THEAMBOONLERS, A., CHUTINIMITKUL, S., THANAWONGNUWECH, R., POOVORAWAN, Y. Fatal Avian Influenza A H5N1 in a Dog. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p.1744-1747, 2006.

STANISLAWEK, W.L.; WILKS, C.R.; MEERS, J.; HORNER, G.W.; ALEXANDER, D.J.; MANVELL, R.J.; KATTENBELT, J.A.; GOULD, A.R. **Archives of virology**, v. 147, p. 1287-1302, 2002.

STURM-RAMIREZ, K.M.; ELLIS, T.; BOUSFIELD, B.; PEIRIS, G.M.; WEBSTER, R. H5N1 influenza A viruses from 2002 are highly pathogenic in waterfowl. **International Congress series**, v. 1263, p. 200-204, 2004.

SUBBARAO, K., KATZ, J. Avian influenza viruses infecting humans. **Cell. Mol. Life Sci**, v. 57, p. 1770-1784, 2000.

SWAYNE, D.E., SUAREZ, D.L. Highly pathogenic avian influenza. **Reviews in Science and Technology**, v. 19, p.463-482, 2000.

TAM, J.S. Influenza A (H5N1) in Hong Kong: an overview. **Vaccine**, v. 20, p.S77-S81, 2002.

TERREGINO, C.; NARDI, R.; GUBERTI, V.; SCREMIN, M.; RAFFINI, E.; MARTIN, A.M.; CATTOLI, G.; BONFANTI, L.; CAPUA, I. **Avian pathology**, v. 36, n. 4, p. 337-344, 2007.

VOOREN, C.M., BRUSQUE, L.F. (1999) As aves do ambiente costeiro do Brasil. Biodiversidade e conservação. Relatório Técnico: Avaliação das ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da zona costeira e marinha. Rio Grande do Sul.

WALLENSTEN, A.; MUNSTER, V.J.; FOUCHIER, R.A.M.; OLSEN, B. Avian influenza A virus in ducks migrating through Sweden. **International congress series**, v.1263, p.771-772, 2004.

WEBSTER, R.G., BEAN, W.J., GORMAN, O.T., CHAMBERS, T.M., KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiology Reviews**, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992.

WINKER, K.; McCracken, K.G.; GIBSON, D.D.; PRUETT, C.L.; MEIER, R.; HUETTSMANN, F.; WEGW, M.; KULIKOVA, I.V.; ZHURAVLEV, Y.N.; PERDUE, M.L.; SPACKMAN, E.; SUAREZ, D.L.; SWAYNE, D. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 547-551, 2007.

WHO. Avian influenza A(H5N1) in humans - update 11: Note to national authorities, Situation in Viet Nam, Rapid - and safe - culling of infected poultry: the first line of defence for protecting international public health. 2004. Disponível em: [http://www.who.int/csr/don/2004\\_01\\_28a/en/](http://www.who.int/csr/don/2004_01_28a/en/) Acesso em: 12 dez. 2008.

ZHOU, N.N., SHORTRIDGE, K.F., CLAAS, E.C.J. KRAUSS, S., WEBSTER, R.G. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. **Journal of Virology**, v. 73, n. 4, p. 3366-3374, 1999a.

ZHOU, N.N., SENNE, D.A., LANDGRAF, J.S., SWENSON, S.L., ERICSON, G., ROSSOW, K., LIU, L., YOON, K., KRAUSS, S., WEBSTER, R.G. Genetic reassortment of avian, swine and human influenza A viruses in American pigs. **Journal of Virology**, v. 73, n.10, p. 8851-8856, 1999b.