

Waldyr Pessanha Junior

**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DOS VÍRUS INFLUENZA E DA
DOENÇA DE NEWCASTLE EM POMBOS
(*Columba livia domestica*) NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO**

**PPGVS/INCQS
FIOCRUZ**

2006

**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DOS VÍRUS INFLUENZA E DA DOENÇA DE
NEWCASTLE EM POMBOS
(*Columba livia domestica*) NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO**

Waldyr Pessanha Junior

**Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz**

Orientador : Prof. Claudio de Moraes Andrade

**Rio de Janeiro
2006**

**AVALIAÇÃO DA CIRCULAÇÃO DOS VÍRUS INFLUENZA E DA DOENÇA
DE NEWCASTLE EM POMBOS
(*Columba livia domestica*) NA CIDADE DO RIO DE JANEIRO**

Waldyr Pessanha Junior

Tese submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor.

Aprovado:

Professor: Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos (Doutor – UENF).

Professora: Luz Alba M. G. Fornells Arentz (Doutor – UFRJ).

Professor: Vanderlei Campos da Silva (Doutor – FIOCRUZ).

Orientador: Prof. Cláudio de Moraes Andrade (Doutor – PESAGRO).

**Rio de Janeiro
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Pessanha Jr., Waldyr

Avaliação da circulação dos vírus influenza e da doença de Newcastle em pombos (*Columba livia domestica*) de vida livre na cidade do Rio de Janeiro. / Waldyr Pessanha Junior, Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2006.

xiii, 75 p., il., tab.

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2006.

Orientador: Cláudio de Moraes Andrade.

1. Influenza, 2. doença de Newcastle 3. pombos 4. *Columba livia domestica*. I. Título

Evaluation of Influenza and Newcastle Disease viruses circulation in free pigeons (*Columba livia domestica*) at Rio de Janeiro city

Dedico este trabalho aos meus pais *Waldyr e Alba* por todo carinho força e incentivo dedicados ao longo de minha vida.

A *Ana Paula, Iago, Yohan e Yasmim* que juntos constituem a minha prazerosa fonte de energia.

BIOGRAFIA SUSCINTA DO AUTOR

Waldyr Pessanha Junior, nasceu no Rio de Janeiro em 28 de maio de 1963, filho de Waldyr Pessanha e Alba Zelina Fernandes Pessanha.

Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária em 1983 na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se no ano de 1987.

Trabalhou na iniciativa privada na função de Clínico-Cirurgião, ocasião em que se especializou em Homeopatia Veterinária pelo Instituto Hannemaniano, com curso realizado no período de 1991 a 1992.

Em 1996 foi selecionado para a realização do Curso de Mestrado em Medicina Veterinária, na Área de Concentração de Patologia Animal e da Reprodução, conferindo o grau de *Magister Scientiae* em 1998 pela Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Nesta mesma casa, exerceu nos anos de 1997 e 1998, a função de Professor Substituto da Disciplina de Anatomia Patológica.

No ano de 2001 foi selecionado para o Curso de Doutorado em Vigilância Sanitária na Fundação Oswaldo Cruz, pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde.

Em 2002, ingressou para o quadro da Secretaria Estadual de Agricultura Abastecimento Pesca e Desenvolvimento do Interior, onde atua como Médico Veterinário da Coordenadoria de Defesa Sanitária Animal, até a presente data.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela presença, auxílio nas decisões tomadas e força em mais uma etapa de minha vida.

Ao meu orientador Dr. Cláudio de Moraes Andrade, pelos ensinamentos, apoio e credibilidade recebidos ao longo dos anos, e que foram fundamentais para realização deste trabalho. Agradeço em especial a oportunidade do convívio em família e acima de tudo a amizade.

Aos meus pais, por seus exemplos de vida, suas atitudes, pelo carinho dedicado e por serem meus pais.

A Ana Paula, minha esposa, por todo o apoio, parceria e compreensão dedicados.

A Marilene e Edílson por todo carinho e suporte prestados

Aos compadres Marcos Mafepe e Arnaldo Bill pelo auxílio nas coletas de amostras.

Aos companheiros do NDA Araruama, Alfredo Cardoso, Hélio José, e Luis Alberto por todo o apoio prestado.

Aos amigos Bernardo, Carla Mota e Gabriele Salles pela colaboração e convívio em diferentes etapas do trabalho, amenizando a saudade da época do LVV da UFRRJ.

A Dra. Marilda M. Siqueira pelos conselhos e colaboração

Ao Dr. Fernando C. Motta por todas as dicas e apoio

Ao companheiro Ricardo e a equipe do COMIC pela colaboração prestada ao longo desta jornada.

A Granja Tolomei® pelo apoio e suporte prestados.

A Dra. Máira Halfein pela confiança depositada e por todo apoio prestado através da cessão das instalações do LBA da PESAGRO/RIO para o desenvolvimento deste trabalho.

A equipe da virologia do LBA da PESAGRO/RIO, Alba, Carlinhos, Karine, Lívia, Marcela, Rafael, pelos ensinamentos, auxílio e prazerosos momentos de convívio, mesmo diante das dificuldades diárias.

RESUMO

No presente trabalho, foi realizada uma revisão bibliográfica sobre o vírus influenza, enfatizando sua ação e correlacionando-o com as espécies aviárias, com enfoque diferenciado para os pombos domésticos (*Columba livia domestica*). Alguns aspectos tais como as condições ambientais, o estreito contato com o homem e a disseminação destas aves nos centros urbanos e em diferentes pontos do mundo, foram considerados. Durante o estudo da interação entre homens e pombos, outro agente patogênico mereceu atenção, por ocasião da revisão bibliográfica e por ser considerado o impacto financeiro causado na avicultura, o vírus da doença de Newcastle. Concomitante à revisão, foram analisadas 322 amostras de fezes de pombos, coletadas em praças públicas em várias áreas do município do Rio de Janeiro. Para tal análise foram utilizadas diferentes técnicas, tais como: inoculação em ovos embrionados, hemaglutinação, inibição da hemaglutinação e reação da polimerase em cadeia. As amostras testadas não apresentaram atividade hemaglutinante, bem como, não apresentaram positividade para a presença do vírus influenza e nem para o vírus da Doença de Newcastle, quando submetidas à prova de PCR. Com isto, pôde-se verificar a inexistência dos vírus na população de aves estudada, o que demonstrou não oferecer risco potencial para transmissão destas patologias, no presente momento.

ABSTRACT

In the present work, influenza was carried through a bibliographical revision on the virus, emphasizing its action and correlating it with the avian species, with approach differentiated for the domestic pigeons (*Columba livia domestica*). Some aspects such as the ambient conditions, the narrow contact with the man and the dissemination of these birds in the urban centers at different points of the world had been considered. During the study of the interaction between men and pigeons, another pathogenic agent had deserved attention, for occasion of the bibliographical revision, to caused financial impact in the poultry keeping, the virus of Newcastle disease. Concomitant to the bibliographical revision, 322 excrement samples had been analyzed of pigeons, collected in public squares in some areas of the city of Rio de Janeiro. For such analysis, different techniques had been used, such as: inoculation in embrionatted eggs, hemagglutination, inhibition of the hemagglutination and polymerase chain reaction. The tested samples had not presented hemagglutination activity, as well as, had not presented positivism for the presence of the virus influenza and nor for the Newcastle virus when submitted to the test of PCR. With this, the inexistence of the viruses in the studied population of birds could not be verified, what it demonstrated not to offer potential risk for transmission of these pathologies, in the present moment.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO

1=> O POMBO	2
1.1. Introdução	2
1.2. Ciclo Reprodutivo	2
1.3. Saúde Pública	3
1.4. Perdas Econômicas	3
1.5. Prevenção e Controle	4
2=> INFLUENZA	6
2.1. Introdução	6
2.2. Vírus Influenza	7
2.2.1. Classificação	8
2.2.2. Nomenclatura	8
2.2.3. Morfologia	8
2.2.4. Estrutura e Composição Química	9
2.2.5. Resistência e Inativação	10
2.3. Influenza Aviária	11
2.3.1. Histórico	11
2.3.2. Transmissão x Fontes de Infecção	12
2.3.3. Ocorrência	13
2.3.4. Vírus Influenza Aviária	16
2.3.5. Epidemiologia	20
2.3.6. Sinais Clínicos	23
2.3.7. Lesões	23
2.3.8. Diagnóstico	24
2.3.9. Profilaxia e Controle	24
2.3.10. Impacto Sócio-Econômico	25
2.3.11. Influenza Aviária no Brasil	26
2.3.12. Influenza Aviária como Zoonose	27
3=> DOENÇA DE NEWCASTLE	29
3.1. Introdução	29

3.2. Vírus da Doença de Newcastle	29
3.2.1. Classificação	29
3.2.2. Morfologia	31
3.2.3. Estrutura e Composição Química	31
3.2.4. Resistência e Inativação	31
3.2.5. Ocorrência	31
3.2.6. Epidemiologia	32
3.2.7. Fontes de Infecção x Transmissão	32
3.2.8. Sinais Clínicos	32
3.2.9. Lesões	33
3.2.10. Diagnóstico	34
3.2.11. Profilaxia e Controle	34
3.2.12. Impacto Sócio-Econômico	34
4=> MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1. Material	36
4.1.1. Vírus	36
4.1.2. Fezes	36
4.1.3. Solução Salina Tamponada, pH 7.2 (PBS)	36
4.1.4. Ácido Citrato Dextrose (A.C.D.)	37
4.1.5. Hemácias de Galinha	37
4.1.6. Microplacas, Pipetadores/Diluidores e Ponteiras	37
4.2. Métodos	37
4.2.1. Cálculo do Número Amostral	37
4.2.2. Coleta de Amostras	38
4.2.3. Pontos de Coleta de Amostras	39
4.2.4. Tratamento das Amostras	40
4.2.5. Inoculação em Ovos Embrionados	40
4.2.6. Prova da Hemaglutinação e da Inibição da Hemaglutinação	43
4.2.6.1. Prova da Hemaglutinação	43
4.2.6.2. Prova da Inibição da Hemaglutinação	43
4.2.7. Caracterização Molecular dos Clones Virais	43
4.2.7.1. Purificação do RNA viral	44
	X

4.2.7.2. Transcrição Reversa (RT-PCR)	45
4.2.7.3. Primeira PCR	45
4.2.7.4. Segunda PCR	46
4.2.7.5. Eletroforese em Gel de Agarose	47
5=> OBJETIVOS	49
5.1. Gerais	49
5.2. Específicos	49
6=> LOCAL E INFRAESTRUTURA PARA REALIZAÇÃO DO TRABALHO	50
6.1. Laboratório de Biologia Animal da Pesagro/Rio de Janeiro (LBA)	50
7=> RESULTADOS	51
8=> DISCUSSÃO	52
9=> CONCLUSÃO	55
10=> REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	56
11=> ANEXOS	65
Anexo 1 – Programação Utilizada na RT-PCR para VIA	66
Anexo 2 – Lista das Figuras	67
Anexo 3 – Lista dos Quadros	68
Anexo 4 – Lista dos Gráficos	69
Anexo 5 – Lista de Abreviaturas	70
Anexo 6 – Mapa 1 Densidade Populacional na Cidade do Rio de Janeiro	71
Anexo 7 – Mapa 2 Eixos Viários	72
Anexo 8 – Mapa 3 Pontos de Coleta	73

INTRODUÇÃO

Considerando a estreita relação entre pombos e homens em grandes centros urbanos, este trabalho procurou realizar uma revisão bibliográfica sobre o Vírus Influenza, enfatizando sua ação e correlacionando-o com as espécies aviárias, com enfoque diferenciado para os pombos domésticos (*Columba livia domestica*).

Além deste, utilizaram-se amostras de fezes destas aves, coletadas em praças públicas do município do Rio de Janeiro, na tentativa inicial de verificar a presença do Vírus Influenza neste material através de provas como a de hemaglutinação (HA) e a da reação da polimerase em cadeia (PCR).

Existe atualmente, por parte das autoridades mundiais e de especialistas no assunto, grande preocupação com o monitoramento de espécies que possam carrear e disseminar tal agente patógeno, principalmente após o ano de 1997, quando na Ásia, mais precisamente em Hong Kong, 18 pessoas adoeceram e tal situação culminou com seis óbitos humanos. Posteriormente, tal fato foi atribuído ao vírus da gripe aviária.

Outro importante agente patógeno pesquisado foi o Vírus da Doença de Newcastle, que apesar de não apresentar uma posição de destaque quanto a seu potencial zoonótico, é responsável por uma doença capaz de causar grandes perdas para avicultura mundial, sendo considerado por muitos, como responsável por uma das mais importantes doenças que acometem as aves, pois algumas cepas podem ter ações devastadoras sobre os plantéis, causando elevada mortalidade e conseqüentemente grandes perdas econômicas para a avicultura na área do foco, com forte repercussão comercial nos níveis nacional e internacional.

1 . O POMBO

1.1. Introdução

Pertencente à família Columbidae, o gênero *Columba* conta com mais de cinquenta espécies no mundo, sendo o *Columba livia domestica* a mais conhecida do homem, pela proximidade no convívio diário, principalmente em ambientes urbanos.

Originários da Europa, os pombos domésticos encontram-se distribuídos por todo o mundo, exceto nas regiões polares. Trazido para o Brasil pela família real portuguesa, o pombo adaptou-se rapidamente ao nosso clima e geografia (Neto & Nunes, 1997) e devido ao fato destas aves já serem domesticadas, encontraram abrigo facilmente nas estruturas arquitetônicas das áreas urbanas, aliado a uma farta oferta de alimentos.

O Brasil conta hoje com cerca de 176 milhões de habitantes, cifra que o situa como o quinto país mais populoso do mundo. Contudo esta população é mal distribuída em seu território, fazendo com que quatro em cada cinco brasileiros habitem em grandes aglomerações urbanas. A cidade do Rio de Janeiro conta com a terceira maior aglomeração urbana de nosso continente, com cerca de 12 milhões de habitantes, ficando atrás apenas de Buenos Aires que possui 13,8 milhões e São Paulo 19.9 milhões de habitantes respectivamente (Atlas Geográfico Mundial, 2005). Com tamanha densidade populacional o convívio entre pombos e homens, na cidade do Rio de Janeiro tornou-se mais intenso. Isto facilita a obtenção dos grãos, sementes e restos de alimentos, que constituem seu cardápio principal, criando assim um vínculo que hoje se traduz em um estreito contato, uma verdadeira dependência do homem. Tanto que atualmente, muitas destas aves se condicionaram e não possuem habilidade para voar mais que umas poucas centenas de metros para se alimentar (Rose et al., 2006).

1.2. Ciclo Reprodutivo

Os pombos têm um ciclo reprodutivo regulado pela disponibilidade de alimento, fazendo com que em ambientes urbanos a capacidade reprodutiva de tais aves aumente, passando de duas a três ninhadas por ano para quatro a seis ninhadas por ano, sendo este um dos principais fatores de proliferação dos pombos em grandes cidades, pois a cada ninhada a fêmea coloca de um a dois ovos que são chocados por um período de 17 a 18 dias, dando origem a filhotes que em aproximadamente quatro ou cinco semanas já conseguem voar (Neto & Nunes, 1997). Associado a esta farta oferta de alimentos, poderíamos citar dois outros

fatores que muito contribuem para o aumento na população desta espécie em grandes cidades, são eles: a grande quantidade de abrigos e a ausência de predadores naturais. Tais fatos fazem com que os pombos atualmente detenham o *status* de pragas urbanas.

Com relação à sua longevidade, os pombos quando em centros urbanos podem viver aproximadamente de três a cinco anos, contudo sabe-se que em condições de vida silvestre estas mesmas aves chegam a viver por um período de até 15 anos (Oliveira *et al.*, 2003).

Sabe-se que os pombos possuem uma ótima capacidade de vôo, contudo existem relatos descrevendo que estas aves não se deslocam em seu raio de ação mais que 500 metros, quando em áreas urbanas (Neto & Nunes, 1997).

1.3. Saúde Pública

A elevada concentração de pombos em áreas urbanas é prioritariamente um problema de saúde pública, pois são grandes os transtornos provocados, principalmente em função da quantidade de fezes eliminadas em janelas, sacadas, beirais, praças, carros, assim como é grande a quantidade de agentes patógenos, na maior parte das vezes veiculados pelos dejetos destas aves.

Dentre as doenças que podem ser transmitidas pelos pombos podemos citar: ornitose, salmonelose, histoplasmose, criptococose, toxoplasmose, aspergilose, alergias respiratórias e dermatites (Oliveira *et al.*, 2003). A maior parte das patologias transmitidas pelos pombos ocorre por inalação de poeira, oriunda das fezes secas destas aves, contendo os agentes infecciosos. Em alguns casos, porém, a transmissão ocorre pela ingestão de alimentos contaminados por fezes destes pombos, como acontece nos quadros de salmoneloses. Quando em contato com a pele do homem, alguns ácaros dos pombos podem causar dermatites de contato ([www. citysaude.com](http://www.citysaude.com) - 2000).

1.4. Perdas econômicas

Os problemas causados pela presença crescente dos pombos nos ambientes urbanos, não se limitam aos riscos à saúde da população, gerando prejuízos financeiros em diversos setores, como por exemplo: contaminação e consumo de alimentos em armazéns e fábricas de gêneros alimentícios, danos a fiações elétricas, entupimento de calhas e canos de drenagem de águas pluviais com penas, carcaças e excrementos, corrosão de estruturas físicas de edifícios e equipamentos de ar condicionado, danos às pinturas dos automóveis e das fachadas dos prédios ([http:// www.ib.usp.br/ceo/jardim/problemaspomb.htm](http://www.ib.usp.br/ceo/jardim/problemaspomb.htm)). A real dimensão destes danos se

torna mais evidente quando nos recordamos que os pombos apresentam o sistema digestivo curto, fazendo-os defecar constantemente, lembrando que as fezes destas aves são extremamente ácidas corrosivas, danificando e contaminando equipamentos, veículo, produtos armazenados e etc. (Oliveira *et al.*, 2003).

1.5. Prevenção e Controle

São muitas as medidas que podem ser adotadas no sentido do controle populacional dos pombos em ambientes urbanos, controle este que é fundamental como medida preventiva e de combate à transmissão de diversos agentes patógenos veiculados por estas aves, que por outro lado também carregam toda uma simbologia religiosa, de paz e de amor, resultando em uma enorme simpatia de boa parte da população por tais aves, o que muitas vezes dificulta a implantação de medidas de controle.

Independentemente do conjunto de medidas adotadas em um programa, um fator limitante e prioritário para o controle dos pombos é a supressão alimentar (Oliveira *et al.*, 2003), com resultados diretos na redução do potencial reprodutivo e da densidade populacional destas aves.

Outras medidas que podemos citar passam por:

- campanhas de educação sanitária,
- remoção de ninhos,
- vedação de espaços com potencial de abrigo para estas aves,
- emprego de elementos assustadores como manequins de predadores ou fogos de artifício,
- e o acondicionamento adequado dos restos alimentares e do lixo.

Algumas medidas também utilizadas são consideradas polêmicas por diferentes fatores, e dentre elas citamos:

- a utilização de substâncias anticoncepcionais,
- o emprego de cercas eletrificadas,
- e a utilização de armadilhas para captura.

Vale ressaltar que, na remoção de ninhos e limpeza dos excrementos, faz-se necessário a utilização de máscaras bem como o umedecimento das fezes, a fim de evitar a inalação de agentes patógenos.

As medidas adotadas em um determinado programa devem atender aos requisitos técnicos, não causando sofrimento para os animais e, portanto com a aceitação da sociedade e das entidades protetoras dos animais, estando amparada pela legislação vigente.



Figura nº.1. - Mulher alimentando pombos em praça pública.

2 . INFLUENZA

2.1. Introdução

Em meados de 1900, surgiu à hipótese de ser a gripe causada por um vírus, isto se deu em face de descoberta da existência de elementos filtráveis. De posse desta informação Wilson Smith, conseguiu reproduzir a doença em furões, através da inoculação de suas próprias secreções respiratórias, bem como a de pacientes gripados.

No passado o termo Influenza era utilizado para descrever doenças respiratórias de caráter indeterminado, que afetavam os mamíferos, sendo nos dias de hoje empregado para descrever doenças respiratórias nos animais cujo agente etiológico seja definido como Vírus Influenza.

Numerosas epidemias com as características da influenza foram descritas no passado afetando homens e animais. Tais epidemias eram e continuam sendo cada vez mais, importantes viroses, tanto em veterinária quanto em saúde pública.

Surtos de influenza ocorrem em qualquer lugar do mundo, ao longo do ano, como resultados da interação entre os vírus, os hospedeiros e as condições ambientais. Usualmente apresentam ataque súbito e rápida disseminação em uma determinada região geográfica.

As pandemias têm sido documentadas desde o século XVI (WHO, 2005) e nos últimos 400 anos, pelo menos 31 delas foram registradas (Lazzari, 2004 apud Kamps, 2006). Durante o século XX ocorreram três pandemias. Em 1918 a chamada gripe Espanhola levou à óbito cerca de 40 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo considerada a mais letal epidemia de gripe da história moderna e que desapareceu tão rapidamente quanto surgiu (Taubenberger *et al.* 2005). Em 1957 foi a vez de a gripe Asiática ceifar cerca de um milhão de vidas humanas e por último em 1968 a denominada gripe de Hong Kong matou aproximadamente um milhão de pessoas. Os impactos alcançados por suas mortalidades colocaram-as nas condições de devastadora, moderada e branda respectivamente.

Em humanos, embora a morbidade mais alta esteja em pessoas com 20 anos ou menos, a taxa de mortalidade mais alta ocorre entre pessoas com 65 anos ou mais. A mortalidade média de humanos por influenza em adultos de 65 anos de idade ou mais velhos a cada ano é de 1:2200. A pandemia de 1918 ocasionou alta mortalidade em jovens adultos e naqueles acima de 65 anos, característica que não se repetiu em pandemias subseqüentes. Nas epidemias de 1957 e 1968, muitas pessoas faleceram e um em cada 300 adultos com 65 anos de idade ou mais morreu. Embora a mortalidade humana seja mais alta no primeiro ano de surto com novo subtipo, a mortalidade acumulada nos anos seguintes interpandemia é

significativamente mais alta que a do primeiro ano (Murphy, 1996).

A disseminação da doença pode ser feita de várias maneiras, por exemplo, através de aves doentes ou mesmo portadoras assintomáticas, como observado em algumas espécies migratórias. Tal fato é motivo de atenção por parte de autoridades e pesquisadores no assunto, pois no momento do deslocamento, tais aves migratórias poderiam infectar diferentes espécies animais e inclusive as aves domésticas do nosso plantel.

Entre as aves, o pombo doméstico (*Columba livia domestica*) é uma espécie bastante conhecida do homem, com quem aprendeu a conviver coabitando, nos mesmos espaços urbanos e encontrando nesta relação condições ideais para sua sobrevivência e reprodução.

Neste trabalho, considerando a estreita relação entre pombos e homens em grandes centros urbanos, utilizamos amostras de fezes coletadas destas aves, em praças públicas do município do Rio de Janeiro, na tentativa de identificarmos neste material a presença do vírus da influenza. Outro agente patógeno pesquisado foi o vírus da doença de Newcastle, devido a sua importância como responsável por doença capaz de gerar grandes perdas para avicultura nacional. No presente momento estes agentes são motivo de preocupação por parte das autoridades sanitárias fazendo com que mantenham atualizadas as normas de conduta e procedimento frente a episódios suspeitos e situações de risco, padronizando as ações de prevenção e controle das referidas patologias.

2.2. Vírus Influenza

O Vírus da Influenza foi primeiramente isolado em 1901 (Alexander, 2000), entretanto ele não foi identificado como influenza A até 1955 (Schafer, 1955 *apud* Salcedo, 1980).

São conhecidos três tipos de Vírus Influenza: A, B e C. Esses vírus são altamente transmissíveis e podem sofrer mutações (transformações em sua estrutura genética), sendo que o tipo A é mais mutável que o B e este mais mutável que o tipo C. Os tipos A e B causam maior morbidade e mortalidade que o tipo C. Geralmente as epidemias e pandemias estão associadas ao vírus do tipo A. O tipo C tem pouca importância clínica e epidemiológica não sendo relacionado a nenhuma grande epidemia.

O Vírus da Influenza é o agente etiológico de uma das mais importantes doenças, para a população humana em todo o mundo, pois pode causar desde pequenos surtos focais até grandes epidemias mundiais ou pandemias (Lenette *et al.*, 1995) e seu diagnóstico precoce em laboratórios credenciados é preconizado pelas autoridades sanitárias (Brasil-MAARA, 1994). O vírus da influenza contém em sua estrutura um envelope composto pelas glicoproteínas: hemaglutininas e neuraminidases, as quais conjuntamente definem os diferentes subtipos de

vírus conforme a presença de uma entre as 16 diferentes hemaglutininas e uma entre as 9 diferentes neuraminidases já identificadas nos vírus aviários. Os vários subtipos diferentes de vírus de influenza aviária variam muito quanto ao seu grau de patogenicidade nas diferentes espécies de aves (Brentano, 2006). Seu genoma de RNA fita simples possui oito segmentos, dos quais três codificam os principais antígenos que são a hemaglutinina (H) e a neuraminidase (N) que caracterizam os subtipos e para nucleoproteína (NP) que determina o tipo (Acha, 1986; Fouchier, 2005 *apud* Kamps, 2006).

2.2.1. Classificação

O Vírus Influenza pertence à família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus*, e encontra-se dividido em tipos A, B e C que são diferenciados em função da composição da nucleoproteína (NP) e da proteína de matriz (M1) (Horimoto, 2001). Os principais determinantes antigênicos dos Vírus Influenza A e B são as hemaglutininas (H) e as neuraminidases (N) que são glicoproteínas capazes de determinar os diferentes subtipos do vírus. A base antigênica destas glicoproteínas, atualmente dispõe de dezesseis H (H1 à H16) e nove N (N1 à N9) para formar subtipos (Fouchier, 2005 *apud* Kamps, 2006).

2.2.2. Nomenclatura

A nomenclatura convencional em caso de isolamento de um Vírus Influenza foi desenvolvida por um grupo de estudo da Organização Mundial da Saúde em 1971 (WHO Study Group, 1979) e nos dias de hoje ainda é a forma empregada para caracterizar este vírus, descrevendo primeiramente o tipo do vírus, seguida pela espécie hospedeira (omiti-se em caso de origem humana), localização geográfica, número de série e ano de isolamento. Para o Vírus Influenza tipos A, a hemaglutinina e a neuraminidase são adicionadas entre parênteses, informando assim o subtipo. Como exemplo podemos citar as amostras de origem aviária do surto corrente de H5N1 da Ásia que foram isoladas de gansos na província Chinesa de Guangdong, sendo descrito da seguinte forma: A/goose/Guangdong/1/96 (Werner & Harder, 2006).

2.2.3. Morfologia

O Vírus Influenza, é muito pleomórfico, oscilando entre as formas esférica e

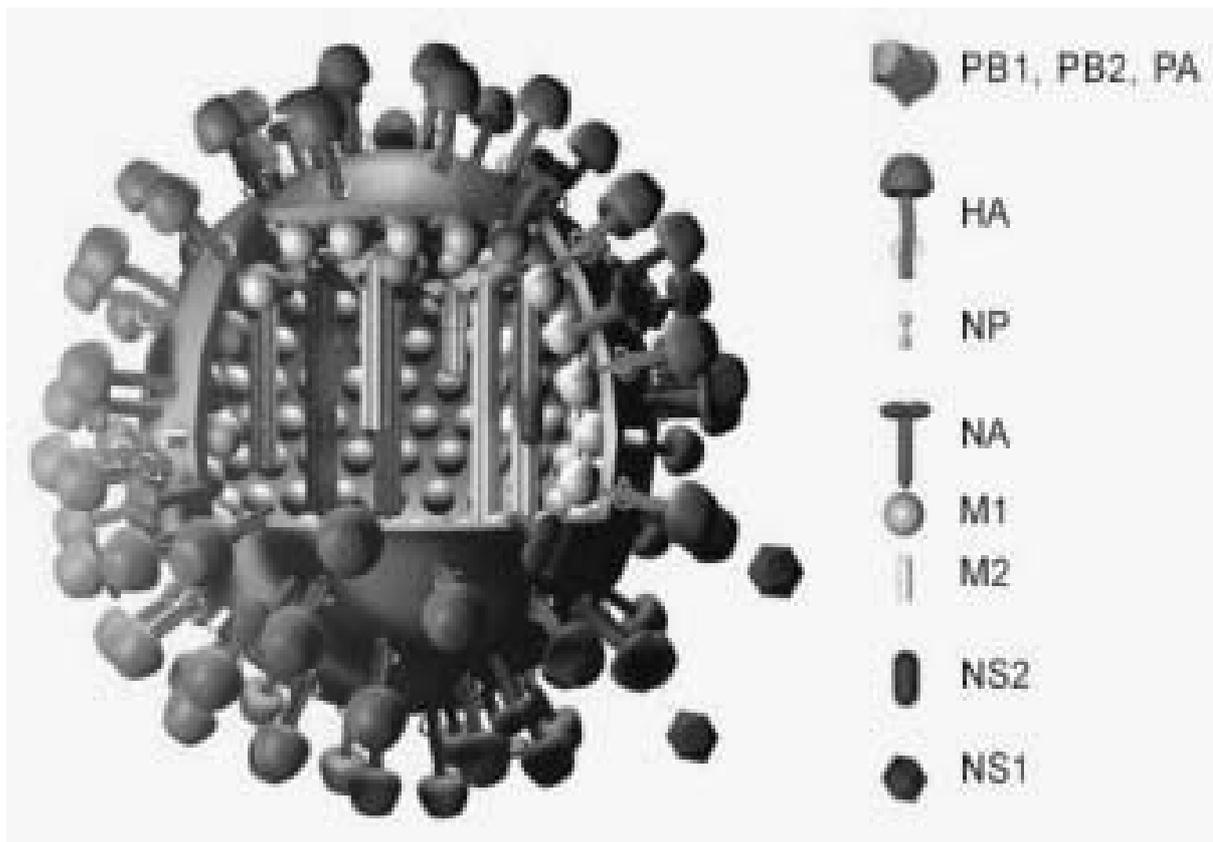
filamentosa, com tamanho variando entre 80 a 120 nm, apresenta-se envelopado por membrana lipídica da qual se projetam espículas de seção triangular e com aproximadamente 10 nm de comprimento. Estas projeções são hemaglutininas, e entre elas encontram-se protusões com forma de cogumelos compostas de neuraminidasas, que junto com as hemaglutininas constituem os antígenos de superfície (Pelczar *et al.*, 1981).

2.2.4. Estrutura e composição química

O Vírus Influenza possui uma composição química que varia de acordo com o subtipo e também com a célula hospedeira, apresentando 70 – 75% de proteínas, 20 – 24% de lipídios, 0,8-1,1% de ácido ribonucleico de cadeia simples e 5 – 8% de carboidratos (Salcedo, 1980). A variação na composição é mais acentuada no que se refere à proporção e composição dos lipídios e carboidratos. Tais lipídios presentes no vírus estão localizados no envoltório viral e são na maioria fosfolipídios, colesterol e alguns glicolipídios. A ribose, galactose, manose, frutose e glicosaminas representam os carboidratos que estão presentes nos vírus sob forma de glicoproteínas e glicolipídios, estando a ribose presente no ácido nucléico viral (Choppin, 1975).

O Vírus Influenza A possui oito segmentos de RNA fita simples de polaridade negativa e é envelopado (Couch & Kasel., 1995). Cada um desses segmentos encontra-se fortemente associado a uma nucleoproteína (NP), que é o principal componente protéico, formando uma estrutura na qual o RNA enovela-se, adquirindo um modelo helicoidal (Mikulášová *et al.*, 2000). Cada segmento de RNA é transcrito em RNAm que codifica um polipeptídio viral. Os polipeptídios do Vírus Influenza são em número de oito, sendo sete deles estruturais, assim descritos: P1, P2 e P3 estão associados à polimerase, uma nucleoproteína (NP) ligada ao ácido nucléico, uma matriz protéica (M), a neuraminidase (N) e a hemaglutinina (H). O polipeptídio não estrutural (NS) encontra-se nas células infectadas (Inglis *et al.*, 1976 *apud* Salcedo, 1980).

As hemaglutininas são responsáveis pela adsorção dos vírus aos receptores presentes em diferentes tipos de células, incluindo eritrócitos de várias espécies animais (Hirst, 1941), pela penetração do vírus através da membrana citoplasmática, além de constituir o principal antígeno, para o qual são dirigidos os anticorpos neutralizantes protetores (Couch & Kasel., 1995). Por outro lado, a neuraminidase tem como função a liberação dos vírus do interior da célula após a replicação viral, e da superfície de hemácias após a adsorção (Colman, 1998).



HÁ ou H = Hemaglutinina; M= Proteína Matriz (1 e 2); NA ou N = Neuraminidase; NP= Nucleoproteína; NS= Proteínas não estruturais (1 e 2); P= Polimerases (B1, B2 e A).

Figura nº.2 - Morfologia e composição do Vírus Influenza A. Fonte Dr. Markus Eickmann, Institute for Virology, Marburg, Germany. . <http://www.biografix.de>

2.2.5. Resistência e inativação

O Vírus Influenza apresenta estabilidade em pH neutro, variando entre 7,0 e 8,0, porém todos os subtipos são muito sensíveis ao pH ácido sendo rapidamente destruídos. Os diferentes subtipos requerem tempos diferentes de exposição aos raios ultravioleta para a sua inativação (Lang *et al.*, 1968). O vírus é inativado quando submetido à temperatura de 56°C durante 3 horas ou a 60°C por 30 minutos. Contudo somente mais tarde desaparecerá sua capacidade hemaglutinante (Homme, 1970). O vírus se mantém estável por longos períodos quando em tecidos, fezes e também em água. A capacidade infectante do vírus é destruída sob irradiação gama e luz ultravioleta (Couch & Kasel., 1995). O vírus é muito estável a – 70°C, e pode manter-se viável nesta temperatura por vários anos. A uma temperatura de 4°C a partícula viral mantém sua capacidade infectante por várias semanas (WHO, 2002). Liofilizados e estocados nesta temperatura permanecem viáveis por muito tempo. A -20°C em pouco tempo terão sua capacidade infectante reduzida (Salcedo, 1980).

Em virtude do alto teor de lipídios o Vírus Influenza é inativado pelo éter e pelos

detergentes, sendo sua infecciosidade rapidamente destruída quando tratado com formaldeído, agentes oxidantes, ácidos, hidroxila mina, íons amônio e detergentes como o desoxicolato de sódio e o dodecil sulfato de sódio (Bier, 1975).

2.3. Influenza aviária

Das três principais formas de gripe que existem A, B e C, as duas últimas infectam só humanos e não causam pandemias. O tipo A, que também infecta o homem, é encontrado em outros mamíferos como suínos e equinos, sendo observado também em várias espécies de aves. As aves aquáticas são tidas como reservatórios naturais de todos os subtipos conhecidos de influenza, sendo por vezes assintomáticas, o que favorece a troca de material genético e as mutações, gerando novos vírus capazes de se disseminar entre mamíferos e aves (Taubenberger *et al.*, 2005).

Diversas cepas desse vírus foram isoladas simultaneamente, de aves ornamentais, domésticas ou de granjas nos vários continentes do mundo, mostrando uma larga diversidade antigênica, com isolamento relacionado ou não a quadros clínicos (Couceiro *et al.*, 1987). Em praticamente, todas as regiões do mundo têm sido descrito isolamento de Vírus Influenza A, a partir de espécimes oriundos de aves silvestres que, através de migração possibilitam a expansão da doença às áreas mais diversas do planeta (Karasin *et al.*, 2000; Panigrahy, 1997; Selezione Veterinaria, 1997; Selleck *et al.*, 1994).

2.3.1. Histórico

A primeira descrição de uma doença relacionada com um vírus, posteriormente identificado como da influenza aviária, foi feita na Itália, quando da comunicação de um surto de peste aviária, em 1878. No início do século XX foi determinado que a peste aviária era causada por um vírus filtrável, que causava alta mortalidade em galinhas, perus e outras espécies aviárias (Stubbs, 1964 *apud* Salcedo, 1980).

No final do século XX o Vírus Influenza A aviário (VIA), subtipo H5N1 saltou a barreira interespecie e infectou humanos, quando no ano de 1997, em Hong Kong, 18 pessoas foram hospitalizadas e seis delas faleceram. No início deste século, mais uma vez pudemos observar o H5N1 saltando a barreira interespecie quando, em fevereiro de 2003, pai e filho originários de Hong Kong foram infectados após viagem ao sul da China e o pai veio a falecer. A origem da infecção em ambos os casos foi relacionada ao contato com pássaros

doentes ou mercados que comercializam aves vivas (Hitt, 2004).

2.3.2. Transmissão x Fontes de Infecção

Em praticamente todas as regiões do mundo, tem sido descritos isolamentos de Vírus Influenza A e Vírus da Doença de Newcastle, a partir de espécimes oriundos de aves selvagens que, através da migração, possibilitam a expansão da doença às áreas mais diversas do planeta.

A influenza aviária (IA) é uma das enfermidades avícolas da lista A do Escritório Internacional de Epizootias (OIE) de notificação compulsória ao Serviço Veterinário Oficial do Brasil. Sua principal via de transmissão é sem dúvida, a horizontal, representada principalmente por excreções e secreções de aves. Vale ressaltar que a infecção pelo vírus da IA ocorre, primordialmente, em células de rápida multiplicação, como as do trato respiratório e digestivo, fazendo com que secreções respiratórias e fezes possam conter elevada carga viral (Vranjac, 2006).

A exposição às aves infectadas, suas excreções e secreções ou solo contaminado pode resultar em infecção humana. Alimentos, água, equipamentos e roupas contaminadas também exercem um importante papel na transmissão desta doença. Todas as aves são susceptíveis ao vírus da influenza A, porém algumas espécies são mais resistentes do que outras. Contudo, o vírus tem alta capacidade de transmissibilidade e as aves migratórias contribuem para sua disseminação intercontinental (Vranjac, 2006).

As aves aquáticas e outras aves silvestres são as principais fontes de disseminação de diferentes subtipos de vírus de influenza e exercem papel importante no surgimento de novos vírus, pois fornecem o pool de diferentes combinações de genes que resultam na variabilidade dos vírus de influenza observados nos outros animais e no grau de patogenicidade dos vírus encontrados nas variadas espécies. Tais aves muitas vezes apresentam-se clinicamente normais, facilitando desta forma a disseminação do agente. As aves silvestres são, portanto as fontes constantes da natureza na perpetuação e para que periodicamente circulem novos vírus aviários (Brentano, 2006).

Apesar do município do Rio de Janeiro apresentar espaços com características predominantemente urbanas, ainda possuímos nesta cidade lagoas, baías, mangues, parques, hortos, jardins e praças, que mantêm importantes ecossistemas e preservam algumas áreas verdes, não sendo raro observar aves como maitacas e garças, dentre outras, buscarem alimento e pouso em árvores localizadas em praças, que hoje são povoadas por pombos.

O contato das aves domésticas com aves silvestres é determinante para a ocorrência de

surtos nas primeiras. O papel da transmissão mecânica é também importante, principalmente por trabalhadores e técnicos ao transferir fezes infectadas para lotes susceptíveis (Alexander, 2000).

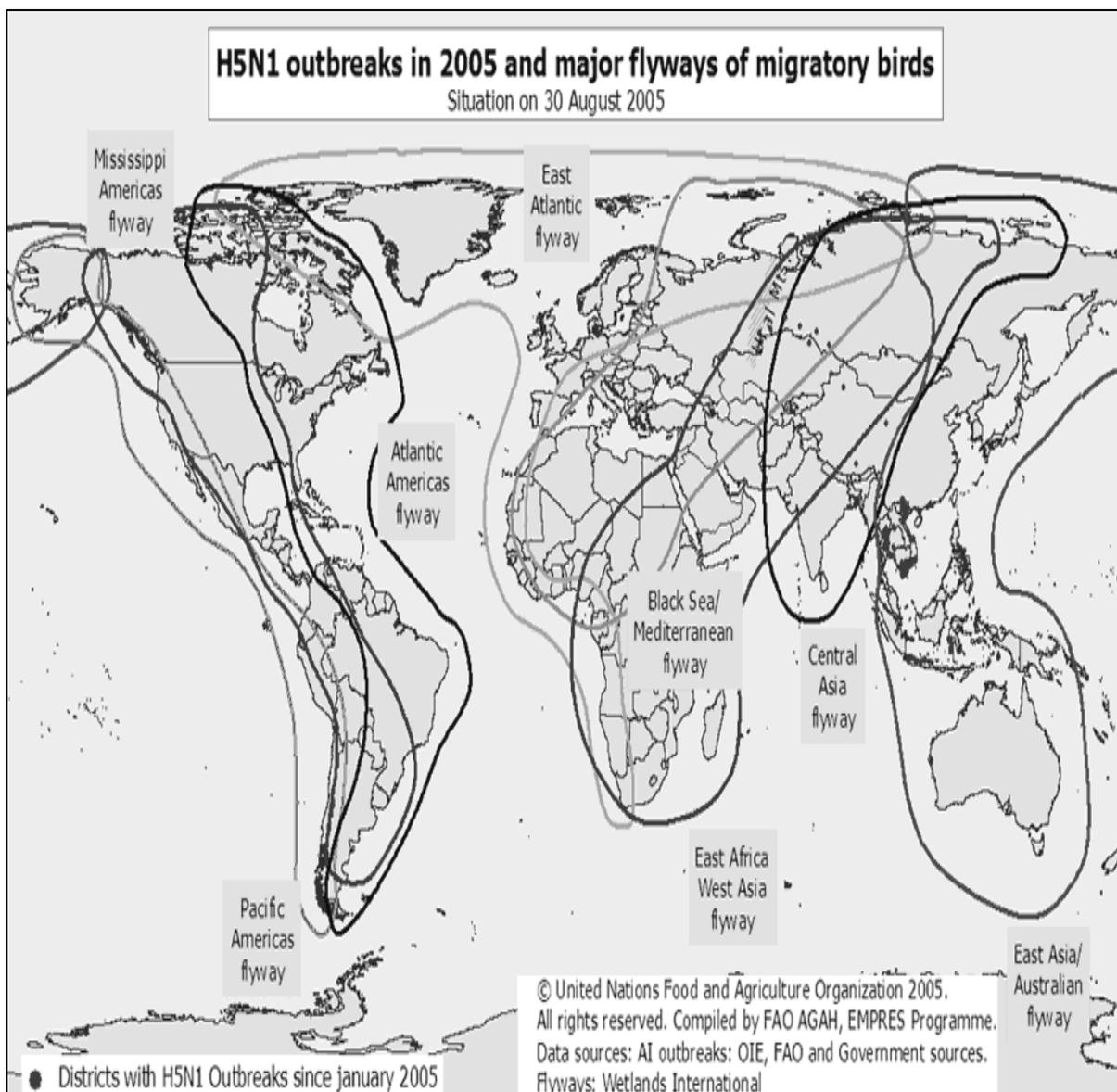


Figura nº.3 - Surtos de H5N1 em 2005 e as principais rotas das aves migratórias.

2.3.3. Ocorrência

Somente o tipo A do Vírus Influenza causa infecção natural em aves, embora todos os 16 subtipos de H e 9 de N tenham sido isolados de aves, nas quais dois grupos distintos, podem ser divididos considerando a virulência. Todos os casos de influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI) têm sido relacionados à influenza A e apresentam os subtipos H5 e H7. Os isolados muito virulentos causam a HPAI, com mortalidade que chega a atingir 100% das aves, embora nem todos isolados desses subtipos sejam de alta patogenicidade. Os demais

subtipos são menos patogênicos para aves, resultando em doença respiratória leve, embora possa ser agravada por infecções concomitantes, imunodepressão e/ou condições ambientais desfavoráveis às aves. Surtos primários de HPAI têm sido descritos desde 1959, cinco em perus e 12 em galinhas. Subtipos causadores de HPAI são raramente isolados de aves silvestres. Por exemplo, HPAI representam 15% dos isolados de patos e gansos e 2% de outras espécies. Em silvestres, entretanto, é mais comum o isolamento de amostras de baixa virulência para aves domésticas (Alexander, 2000).

De acordo com o relatório da O.I.E. de 1997 (O.I.E. Bulletin, 1997), formas de alta patogenicidade do VIA ocorreram em Hong Kong (um surto em abril e dois em maio), na Itália (três surtos em novembro e quatro em dezembro) e Austrália (um surto).

Alta homologia entre os genes internos foi detectada nos isolados H9N1, H6N1 e H5N1 indicando que esses subtipos são capazes de fazer intercâmbio de genes e, portanto, figurar como fonte potencial de isolados patogênicos para humanos, sendo necessária à vigilância epidemiológica para estes isolados em aves aquáticas e domésticas, suínos e humanos (Hoffmann *et al.*, 2000).

O *pool* genético de VIA em aves aquáticas migratórias e de praia sugere que uma baixa transmissão ocorre entre essas aves por todo o ano, caracterizando dois grupos reservatórios com intersecção geográfica em todo o globo. Todos os subtipos de H e N ocorrem nessas aves. Embora tenham sido detectadas evidentes tendências dos isolados serem geograficamente restritos e hospedeiros específicos, caracterizados pela proteína NP, por exemplo, de eqüinos, suínos, gaivotas e outras espécies de aves e isolados também de humanos. Outros genes apresentam extensiva tendência à recombinação genética.

Todas as linhagens de VIA em mamíferos foram originadas do *pool* genético das aves (possível inclusive para influenza B). As análises dos segmentos do RNA que codificam as proteínas das espículas (H, N e M₂) e proteínas internas (RNA transcriptases A, B1 e B2; NP, M e S) de uma grande variedade de hospedeiros e de regiões geográficas distintas permitiram essas conclusões. Os compartilhamentos genéticos de VIA entre essas espécies ocasionam surtos e pandemias, indicando a possibilidade de suínos servir como hospedeiros intermediários para intercâmbio genético entre o VIA de aves (reservatórios) e humanos (Webster *et al.*, 1992).

Nenhum título de anticorpos circulantes específicos contra VIA foi detectado em 100 pombos domésticos (*Columba livia domestica*) da cidade de Santiago do Chile avaliados durante 12 meses (março 1996-março 1997). Títulos muito baixos (1 a 3 log₂) para PMV-1

(doença de Newcastle) e nenhum título para PMV-7 foram detectados (Toro, 1999).

Na China, 20 diferentes espécies de aves oriundas de quatro fazendas foram avaliadas sorologicamente para diversos agentes de doença para as aves industriais. Anticorpos para *Mycoplasma gallisepticum* (Mg), *Salmonella pullorum* (SP), Clamidiose Aviária (CA), Doença de Newcastle (ND), Laringotraqueite Infecciosa (LI), Doença de Marek (DM), Bronquite Infecciosa (BI), Síndrome da Queda da Postura (EDS), Bouda Aviária (FP), Leucose Aviária, Artrite Viral e Cólera Aviária foram detectados em 13 espécies, com Mg ocorrendo como o mais alto índice (25%), seguido de SP (21,5%), CA (16,67%) e ND (15,31%). Anticorpos para Doença Infecciosa Bursal (Gumboro), Coriza Infecciosa, Adenovírus Aviários do Grupo I e Influenza Aviária não foram encontrados e testes intradérmicos de tuberculina foram negativos (Zhang *et al.*, 1996).

Outro estudo foi desenvolvido em outras 13 granjas de aves industriais e uma de aves exóticas, nas quais todas as aves industriais foram negativas para VIA, e 39/50 das amostras de soros das aves exóticas foram positivas para VIA. As aves exóticas tinham histórico de doença clinicamente semelhante à cólera aviária, não resolvida com vacinação contra a cólera aviária e doença de Newcastle ou soroterapia contra a doença infecciosa bursal. A doença causou a mortalidade de 10.000 faisões e o controle de novos episódios foi obtido com a destruição dos faisões sobreviventes e de outras espécies de aves, além da aplicação de limpeza e desinfecção rigorosas (Zhu *et al.*, 1996).

Um estudo epidemiológico desenvolvido na Itália investigou a presença de VIA em faisões criados para esporte em fazendas de caça. As amostras de suabes cloacais de 200 indivíduos não resultaram em isolamento de agente hemaglutinante (Piccirillo *et al.*, 1999).

Em 1997 ocorreu um fenômeno com possibilidades catastróficas, até então inédito para a comunidade científica. Foi notificado em Hong Kong o primeiro caso de transmissão direta de um vírus aviário para humanos. Este vírus subtipo H5N1 foi responsável por 18 infecções, que resultaram em seis mortes (Zhou *et al.*, 1999). Ainda na China em março de 1999 foram reportados sete casos de infecções pelo subtipo H9N2 de influenza aviária em humanos (Bengis, 2004.), o qual, ao contrário do H5N1 e do H7N7 não é altamente patogênico para aves. As pessoas infectadas, entre elas duas crianças, desenvolveram sintomatologia branda de gripe (Hatta & Kawaoka, 2002).

Crianças são a principal fonte de transmissão de Vírus Influenza A na comunidade, visto que as escolas e salas de aulas fornecem as condições de proximidade e aglomeração que favorecem a disseminação, especialmente por aerossóis. O Vírus da Influenza A resiste

nos aerossóis por um inverno inteiro no ambiente de baixa umidade dentro de casa nos climas temperados (dezembro-janeiro a abril-maio nos EUA), contribuindo para a ocorrência estacional de influenza no inverno. A detecção de mutantes de hemaglutinina ao final da primavera tem sido considerada indicação de risco de surto para o próximo inverno (Moriuchi, 1991 *apud* Murphy, 1996).

Um surto de VIA altamente patogênica causado pelo subtipo H7N7 ocorrido na Bélgica no início de 2003 infectou 83 pessoas e culminou com a morte de um veterinário local. Outro recente episódio envolvendo infecções diretas de aves para humanos ocorreu em 2004 no Vietnã e na Tailândia, onde novamente o vírus pertencia ao subtipo H5N1, tendo sido diagnosticado pelo menos 34 casos com 23 mortes (Peiris *et al*, 2004).

Em maio de 2006 o Ministério da Saúde da Indonésia confirmou mais seis casos de infecção humana pelo vírus da influenza aviária H5N1, onde três desses casos foram fatais. Um dos casos ocorreu em um homem de 39 anos. Entre o aparecimento dos sintomas, hospitalização e o óbito, transcorreram 10 dias. A investigação determinou que, o homem limpou as fezes de pombos da calha do telhado de sua casa, pouco antes do início dos sintomas (OMS, 2006).

2.3.4. Vírus da Influenza Aviária

Aves aquáticas e silvestres são consideradas os principais reservatórios naturais do VIA (Webster,1995), estas aves são comumente assintomáticas, podem eliminar vírus por longos períodos bem como estar ainda infectadas com mais de uma cepa (Johnson, 1976).

Além da possibilidade da chegada em nosso território do vírus, por meio de aves migratórias, outras formas de introdução e disseminação devem ser consideradas: movimentação internacional de aves de produção e de companhia, criações consociadas de muitas espécies em um mesmo estabelecimento, o comércio de materiais genéticos, produtos e subprodutos avícolas. Turistas provenientes de áreas infectadas pelo vírus, através de seus calçados e vestimentas podem funcionar como vetores mecânicos.

A influenza aviária é considerada uma zoonose, o que gera preocupação permanente aos agentes de saúde pública, uma vez que subtipos tais como: H5N1, H7N2, H7N3, H7N7 e H9N2 já foram transmitidos de aves domésticas para humanos. O subtipo H5N1 tem-se mostrado altamente patogênico aos seres humanos, ocasionando doença severa e óbitos.

A maioria dos casos de H5N1 foi reportada no sudeste e leste asiáticos, entretanto a OMS tem expressado preocupação com o fato de que nem todos os países estão reportando

epidemias como deveriam. China por exemplo, no passado, negou as epidemias de SARS e HIV (Wikipedia, 2006).

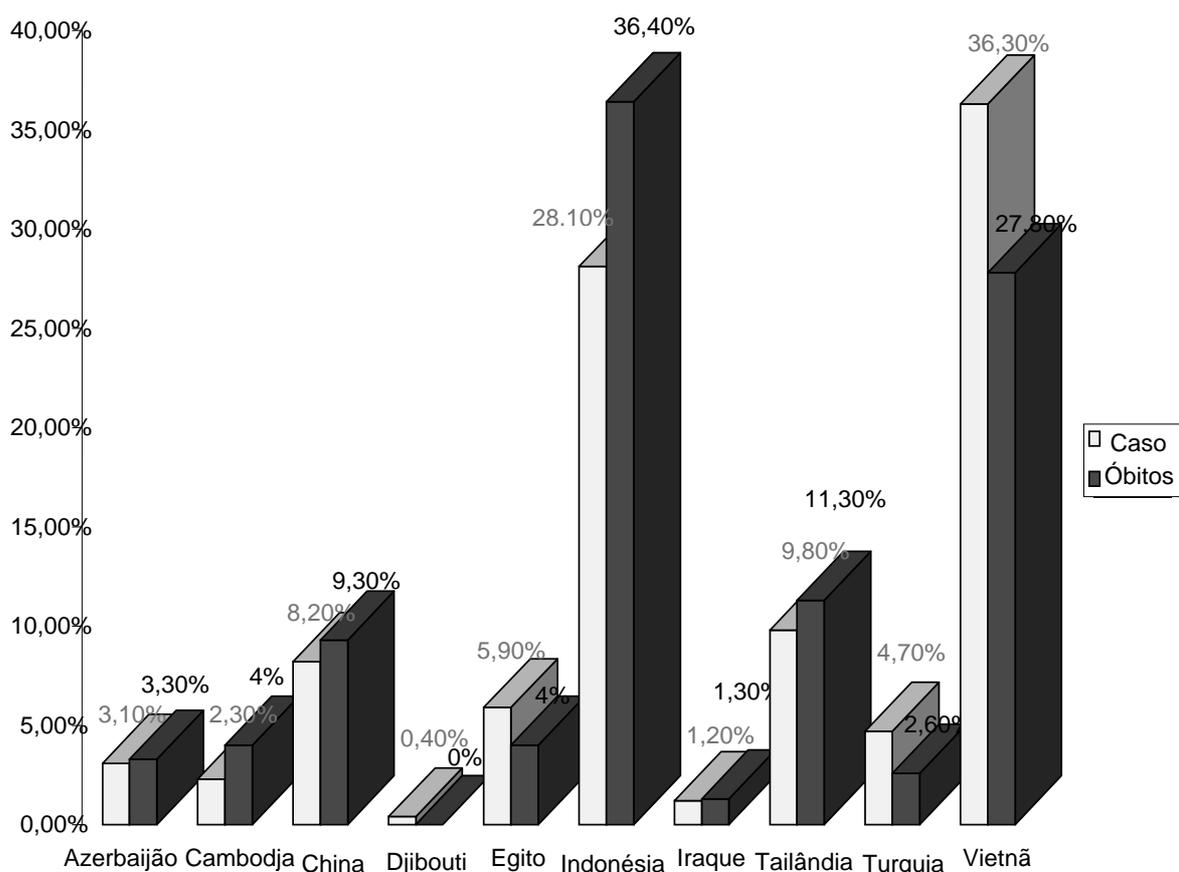
A comunidade científica tem demonstrado grande preocupação de que o vírus possa adquirir a capacidade de transmissão entre humanos, o que neste caso, poderia resultar em uma nova pandemia mundial de gripe (MAPA, 2006).

Em humanos, face ao fato do H5N1 ser um Vírus Influenza, os sintomas podem parecer com os de uma gripe comum, com febre, tosse, garganta seca e músculos doloridos. Contudo, nos casos mais severos podem evoluir para pneumonia com grave comprometimento do aparelho respiratório e eventualmente podem provocar a morte.

Quadro n.º 1 – Casos humanos confirmados de influenza aviária (H5N1).

País	2003		2004		2005		2006		Total	
	Casos	Óbitos								
Azerbaijão	0	0	0	0	0	0	8	5	8	5
Cambodja	0	0	0	0	4	4	2	2	6	6
China	1	1	0	0	8	5	12	8	21	14
Djibouti	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Egito	0	0	0	0	0	0	15	6	15	6
Indonésia	0	0	0	0	19	12	53	43	72	55
Iraque	0	0	0	0	0	0	3	2	3	2
Tailândia	0	0	17	12	5	2	3	3	25	17
Turquia	0	0	0	0	0	0	12	4	12	4
Vietnã	3	3	29	20	61	19	0	0	93	42
Total	4	4	46	32	97	42	109	73	256	151

Gráfico n.º.1 - Percentual de casos humanos confirmados de influenza A aviária (H5N1) de 2003 a 2006.



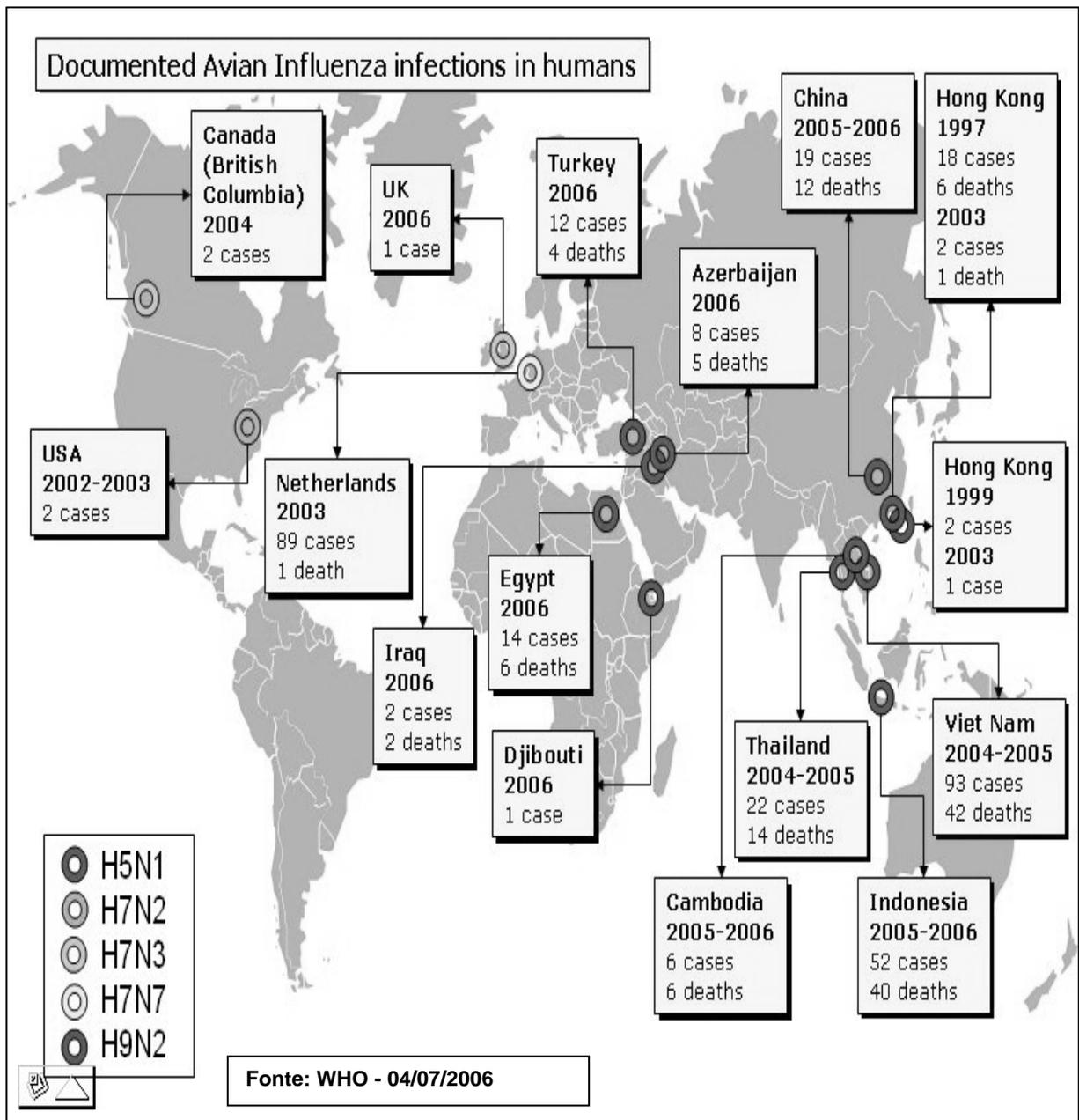


Figura nº.4 - Registros de infecções em humanos pelo Vírus Influenza aviário.

2.3.5 Epidemiologia

Os Vírus Influenza são únicos na habilidade de causar epidemias anuais recorrentes e menos freqüentemente pandemias, atingindo quase todas as faixas etárias num curto espaço de tempo. Isto é possível devido à sua grande variabilidade e capacidade de adaptação, o que é conseguido através das elevadas taxas de mutação apresentadas pelo Vírus Influenza, principalmente nas glicoproteínas de superfície (H e N), tornando-o um agente altamente contagioso.

Epidemias de influenza de gravidade variável têm ocorrido de maneira sistemática a cada um a três anos, predominantemente no inverno. Já as pandemias de influenza, que acometem populações de extensos contingentes, têm ocorrido de forma irregular, geralmente com 30 a 40 anos de intervalo.

Dentre as comunidades, as epidemias e pandemias de influenza iniciam-se de forma abrupta e atingem o pico em duas ou três semanas, com duração total de cinco a oito semanas. O impacto das epidemias de influenza é reflexo da interação entre a variação antigênica viral, o nível de proteção da população para as cepas circulantes e o grau de virulência dos vírus. Os Vírus Influenza estão sujeitos a dois tipos de variações antigênicas, as menores ou *antigenic drift* e as variações maiores, chamadas também de *antigenic shift*.

As variações antigênicas menores (*drifts*) ocorrem a cada dois ou três anos para os subtipos do vírus A e a cada cinco ou seis anos para os vírus do tipo B. Tais variações se devem a mutações pontuais nos segmentos do genoma viral que resultam em mudanças nos aminoácidos que compõem as glicoproteínas de superfície, particularmente na hemaglutinina. Surgem, então, novas variantes virais capazes de escapar da imunidade estimulada por infecção ou vacinação prévia. As mutações pontuais que ocorrem no vírus que foram citadas, são resultados da substituição, deleção ou inserção de aminoácidos. Tais *drifts* surgem em função da pressão imunológica, e são responsáveis pela necessidade constante de atualização vacinal, já que os vírus são capazes de escapar dos anticorpos neutralizantes das cepas circulantes em anos anteriores (Cox, 1998).

As variações antigênicas maiores (*shifts*) são aquelas associadas à completa substituição de um ou ambos os segmentos do genoma viral, que controlam a produção de glicoproteínas de superfície. Essas alterações se devem ao reagrupamento entre vírus humanos e vírus que infectam outras espécies animais, e estão relacionadas com a segmentação do material genético que facilita sua recombinação com o material genético de outros Vírus Influenza sempre que ocorrem infecções mistas. Quando ocorrem grandes variações antigênicas, a maioria da população não tem imunidade para os novos vírus e a

doença dissemina-se rapidamente, afetando indivíduos de todas as faixas etárias.

Uma das dificuldades para o controle da disseminação dos Vírus Influenza se dá pela existência de diversos reservatórios animais, especialmente aves e mamíferos, possibilitando o reagrupamento entre genes de vírus que infectam seres humanos e animais. As grandes pandemias foram conseqüências de variações antigênicas maiores e responsáveis por milhões de mortes nos episódios das Gripes Espanhola (1918-1919), Asiática (1957), e de Hong Kong (1968).

Análises filogenéticas sugerem que um vírus aviário foi introduzido na população humana, causando a pandemia de 1918. Um rearranjo deste vírus com três genes de outro vírus aviário resultou na pandemia de 1957. Em 1968 ocorreu outra mutação, envolvendo o subtipo H2N2, surgido em 1957, e um vírus aviário, apresentando novos genes. Este novo subtipo formado, denominado H3N2 substituiu o subtipo H2N2. O subtipo H1N1 que estava desaparecido da população humana desde 1950, ressurgiu e atualmente circula junto com o H3N2 (Loureiro, 2004).

Devido às epidemias anuais de gripe e ao risco de novas pandemias, o monitoramento epidemiológico do Vírus Influenza é de fundamental importância. Iniciada em 1947 a rede de vigilância epidemiológica da gripe, coordenada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), inclui atualmente cerca de 110 Laboratórios Nacionais de Influenza distribuídos em mais de 80 países, apoiados por quatro Centros de Referência localizados em Londres, Atlanta, Melbourne e Tóquio (http://www.hhs.gov/nvpo/pandemics/flu_4.htm) - acessado em 30/11/2006.

Quadro nº. 2 - Cenário da influenza no mundo um resumo da história

Ano	Nome-Subtipo	Fonte Provável	Impacto
1918	Gripe Espanhola (H1N1)	Hospedeiro suíno ou aviário de um vírus H1N1 mutante	Mais de 40 milhões de óbitos no mundo
1957	Gripe Asiática (H2N2)	Infecção mista de um animal com cepa humana H1N1 e cepa aviária H2N2 na Ásia	Deslocamento do vírus H1N1 que deixou de circular
1968	Gripe de Hong Kong (H3N2)	Infecção mista de um animal com cepa humana H2N2 e cepa aviária H3 na Ásia	Deslocamento do vírus H2N2 que deixou de circular
1977	Gripe Russa (H1N1)	Desconhecida (vírus quase idêntico a cepas epidêmicas humanas de 1950. Reaparecimento simultâneo na China e na Sibéria).	Pandemia benigna, atingindo principalmente coortes pós 1950. Passou a co-circular com a cepa H3N2
1986	H1N1	Holanda. Vírus suíno, derivado de um fonte aviária.	Um adulto com pneumonia grave
1988	Influenza suína (H1N1)	Winsconsin/USA. Vírus suíno, derivado de uma fonte aviária	Óbito de uma mulher grávida, após exposição a um suíno enfermo
1995	H7N7	U.K. Vírus de pato	Um adulto com conjuntivite
1997	Gripe do Frango (H5N1)	Hong Kong. Aves domésticas	18 casos humanos confirmados com 6 óbitos
1999	H9N2	China e Hong Kong. Vírus Influenza similar ao da codorna	7 casos em humanos, com doença leve
2001	H1N2	Recombinação genética dos vírus H1N1 e H3N2.	Circulação na África, Europa, Américas do Sul e Norte e Ásia
2003	Influenza aviária (H5N1)	Hong Kong. Cluster familiar, após visita a província de Fujian, no sul da China	2 casos humanos com evolução para o óbito
	Influenza aviária (H7N7)	Holanda.	169 trabalhadores de granja afetados. Evidência de transmissão direta p/ 2 contatos. Os 169 casos com conjuntivite
2004 /2005	Influenza aviária (H5N1)	Epizootias no Vietnã, Coreia do Sul e Japão e outros países asiáticos, com transmissão direta para humanos em três países	É a primeira vez que tal dispersão geográfica ocorre. Mais de 100 milhões de aves mortas. Mais de 100 casos em humanos desde outubro/05, com elevada letalidade nas formas graves

2.3.6. Sinais Clínicos

Com o período de incubação previsto entre três e cinco dias, os sintomas da influenza variam bastante e dependem de muitos fatores, tais como: idade, espécie afetada, a virulência do vírus e infecções concorrentes na criação. Estas viroses algumas vezes podem causar infecções fatais precedidas de poucos sintomas. Na maioria dos surtos, os sintomas são predominantemente os de uma doença respiratória com depressão severa, inapetência, tosse, espirros, lacrimejamento, sinusite, queda brusca na produção de ovos ou uma combinação destes sintomas. Pode existir diarreia, edema de cabeça e face ou desordens nervosas. A morbidade e a mortalidade são altamente variáveis dependendo de alguns fatores os quais determinaram os sintomas clínicos acima citados.

A infecção pelo Vírus Influenza de alta patogenicidade é uma forma exótica e severa de influenza usualmente vista em galinhas. O início é súbito e o curso é pequeno, as aves afetadas adoecem completamente e a mortalidade pode aproximar-se de 100%. Os sintomas podem relacionar-se ao sistema nervoso, respiratório ou entérico (Whiteman, 1989).

2.3.7. Lesões

As lesões variam muito em função da patogenicidade do vírus. Na maioria dos surtos de influenza em aves, existe inflamação branda à moderada da traquéia, seios da face, sacos aéreos e conjuntivas. Em aves de postura ocorre principalmente regressão do ovário e involução do oviduto.

Vários graus de lesões congestivas, hemorrágicas, transudativas e necróticas têm sido descritas. Em infecções pelo Vírus Influenza de alta patogenicidade, as lesões macroscópicas em aves costumam ser extensas e severas. Exudatos fibrinosos podem ser achados nos sacos aéreos, ovidutos, pericárdio ou no peritônio. As sinusites, particularmente em patos, podem ser acentuadas e os seios nasais podem se distender com o exudato. Pequenos focos de necrose podem estar aparentes na pele ou no fígado, rim, baço ou pulmões. Indicações de danos vasculares frequentemente incluem congestão, edema e hemorragias em diferentes áreas. As lesões clássicas da HPAI incluem cianose e edema de cabeça, pescoço e dos pés, petéquias na região do abdômen e em superfícies mucosa e serosa (Whiteman, 1989). As lesões apresentadas em perus são similares às observadas em galinhas, mas podem não ser tão acentuadas. Patos infectados com HPAI e excretando o vírus, podem não mostrar nenhum sinal clínico ou lesão.

2.3.8. Diagnóstico

O histórico típico, os sintomas clínicos, que incluem depressão severa, inapetência e queda brusca na produção e ovos, aliados as lesões como severa congestão da musculatura, desidratação, edema subcutâneo da cabeça e área do pescoço, descarga nasal e oral, severa congestão da conjuntiva, dentre outros podem ser sugestivos, apesar de serem similares a outras doenças, sendo necessário para o diagnóstico definitivo à realização do isolamento e da identificação viral. O vírus frequentemente pode ser isolado em embriões de galinhas a partir de amostras de traquéia, pulmões, sacos aéreos, exudatos sinusais e suabes cloacais. O vírus hemaglutina hemácias de galinha (Whiteman, 1989).

Para realização do diagnóstico diferencial devem ser priorizadas as seguintes patologias:

- => Cólera aviária
- => Doença de Newcastle velogênica
- => Laringotraqueite infecciosa

2.3.9. Profilaxia e Controle

Considerando que não é recomendado o tratamento de aves que sejam suspeitas ou que apresentem quaisquer sintomas de influenza, as medidas profiláticas ganham maior destaque na adoção do sistema de manejo a ser implementado em uma criação. Dentre as medidas adotadas destacamos as seguintes:

- => Evitar o contato entre aves domésticas do criatório com aves silvestres em particular com as de hábito aquático;
- => Evitar introduzir, no plantel, aves sem o conhecimento de seu “status” sanitário;
- => Em áreas onde a influenza aviária tem sido um problema, utilizar uma rotina de monitoramento através da sorologia das aves ou da pesquisa de anticorpos na gema dos ovos;
- => Realizar controle do trânsito humano nas dependências do criatório;
- => Adoção de procedimentos apropriados de limpeza e desinfecção;
- => Criar lotes de aves com a mesma faixa etária por cada fazenda de criação (sistema tudo dentro tudo fora) e
- => Toda suspeita de influenza aviária deve ser imediatamente reportada as autoridades sanitárias locais

Contudo, diante de surtos outras medidas também devem ser adotadas, das quais destacamos:

=> Todo surto de influenza aviária deve ser imediatamente reportado as autoridades sanitárias locais

=> Abater todos os animais;

=> Livrar-se de todas as carcaças e produtos de origem animal;

=> Limpeza e desinfecção e

=> Aguardar no mínimo 21 dias antes de promover o repovoamento das instalações.

No passado foi considerado contraproducente o uso de vacinas contra HPAI, pois o seu uso podia não conferir imunidade para as aves e ainda introduzir no plantel o agente patógeno. Contudo, nos recentes surtos do Paquistão e México, vacinas inativadas foram utilizadas para combater a rápida disseminação da doença.

2.3.10. Impacto Sócio-Econômico

Na maior parte das vezes um surto traz sérias conseqüências para a sociedade que não se limitam aos efeitos imediatos sobre a economia do país afetado, pois no mundo globalizado onde as distâncias se tornaram menores e as informações fluem com tamanha velocidade, a notícia de um foco de influenza carrega muito mais que embargos de países importadores, vindo acompanhada de reflexos sobre setores como o de turismo, com efeitos mais tardios como o cancelamento de eventos e viagens. Recentemente foi observada a grande expectativa quanto à realização da copa do mundo de futebol na Alemanha, que se via ameaçada em função do curso da influenza na Europa.

A sociedade também sofre com os gastos elevados dos governos em áreas como a de saúde, com a aquisição de vacinas e medicamentos antivirais, muitas vezes de eficácia duvidosa.

Como exemplo de impacto sócio-econômico, podemos citar o fato ocorrido na Holanda no ano de 2003, quando uma forma branda do vírus sofreu mutação, tornando-se agressiva gerando como conseqüência o sacrifício de um quarto da população aviária da Holanda, a um custo de milhões de euros, fazendo com que a União Européia sacrificasse cerca de 30,7 milhões de aves em 1300 aviários, com a finalidade de conter o surto que causou também a morte de um médico veterinário (ProMED-mail – <http://www.isid.org>) Acessado em 28/03/2004.

2.3.11. Influenza Aviária no Brasil

Há ainda pouquíssimos estudos na literatura científica nacional e internacional sobre a ocorrência de VIA nas aves silvestres e ornamentais da fauna brasileira. Os trabalhos descrevem avaliações de fauna local, com amostragem de algumas espécies. Um estudo da fauna de aves da cidade do Rio de Janeiro descreveu a ocorrência e caracterizou estirpe de VIA natural em espécies ornamentais nesse estado (Couceiro, 1987). Contudo, as aves aquáticas e outras aves silvestres são as principais fontes de disseminação de diferentes subtipos de Vírus Influenza e exercem papel importante no surgimento de novos vírus, pois fornecem o “pool” de diferentes combinações de genes que resultam na variabilidade dos Vírus Influenza encontrados em diferentes espécies animais. As aves silvestres são, portanto as fontes constantes da natureza na perpetuação dos vírus aviários e para que periodicamente circulem novos vírus aviários (Brentano, 2006).

Em avaliações sorológicas de plantéis industriais conduzidas em Minas Gerais, em frangos de corte, não foram detectados anticorpos para VIA. Após os surtos de 1983-1984 nos EUA, os pesquisadores investigaram anticorpos para VIA H5N2 em frangos de corte, com vistas a determinar o *status* sanitário específico desses. Para os ensaios laboratoriais, foi utilizada a gel precipitação em ágar, não sendo detectadas quaisquer reações específicas para VIA. Soros de 2000 frangos, entre 49 e 60 dias de idade, de 175 lotes em 96 granjas comerciais das regiões do Alto São Francisco e Metalúrgica de Minas Gerais, colhidos entre 1985 e 1986, foram avaliados. Os resultados indicaram que as estratégias de biossegurança adotadas pelo Ministério da Agricultura, proibindo a importação de aves e ovos férteis dos EUA no período crítico, foram eficientes (Resende *et al.*, 1990).

Atualmente, o Ministério da Agricultura mantém monitoração permanente das aves importadas nas portas de entrada do país. O Projeto de Vigilância Ativa (Projeto de Vigilância, 2001) do Plano Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), coordenado pelo Ministério da Agricultura, em colaboração com instituições públicas (universidades, secretarias de agricultura, institutos de pesquisa, etc.) e privadas (indústria, laboratórios de produção de vacinas e diagnóstico, etc.) prevê também a amostragem para a avaliação permanente dos plantéis comerciais nacionais, que inclui a simultânea avaliação para vírus e anticorpos, para a doença de Newcastle e influenza aviária.

2.3.12. Influenza aviária como zoonose

Em humanos, a ocorrência de influenza tem sido regularmente acompanhada. Um estudo de 12 meses após a implementação do programa de vacinação voluntária indicou que a vacinação não foi suficiente para a redução dos episódios clínicos e faltas ao trabalho em relação aos indivíduos não vacinados (Ramadan *et al.*, 2001).

Em outro estudo, soros de humanos foram avaliados em Belém do Pará para anticorpos contra influenza A e B, nos anos de 1992 e 1993, por inibição da hemaglutinação para anticorpos contra A/Taiwan/1/86 (H1N1), A/Beijing/353/89 (H3N2) e B/Yamagata/16/88. Anticorpos para ambas as estirpes de influenza A foram detectados em 84% (H3N2) e 56% (H1N1) dos soros e níveis mais baixos para o tipo B. Um aumento na incidência de títulos para H3N2 e tipo B foi detectado em 1993 (Santos *et al.*, 1997).

Anticorpos para H3N2 A/Hong Kong/1/68 e A/Bangkok/1/79 e A/Brazil/11/78 (H1N1) foram também investigados em nativos da tribo Kren-Akorore (Parque Indígena do Xingu), tribo contatada pela primeira vez apenas em 1973, para os quais nenhum título de anticorpos foi detectado, indicando a ausência de transmissão por contato prévio e o isolamento dessa população (Nascimento *et al.*, 1985).

Os estudos citados demonstram uma preocupação permanente por parte das autoridades sanitárias com esta doença, que nos últimos 100 anos levou à óbito mais de 40 milhões de pessoas por ocasião de três epidemias. Contudo, no momento atual o que mais preocupa as autoridades é o envolvimento do vírus da influenza aviária H5N1 em episódios recentes, em diferentes países, episódios estes que a partir de 2003, já totalizam mais de 150 óbitos humanos, provocados por transmissão direta do vírus, das aves para os homens. Casos humanos de influenza aviária A têm sido relacionados a contato direto com aves doentes ou mortas nas áreas rurais. Considerando que o H5N1 é antigenicamente novo e altamente patogênico para o homem, e que ele pode adquirir a habilidade para ser eficientemente transmitido de humano para humano, a Organização Mundial de Saúde desde 1997 recomenda para todos os países, que se preparem para uma nova pandemia, a qual é temida, inevitável e possivelmente iminente (Taubenberger, 2005).

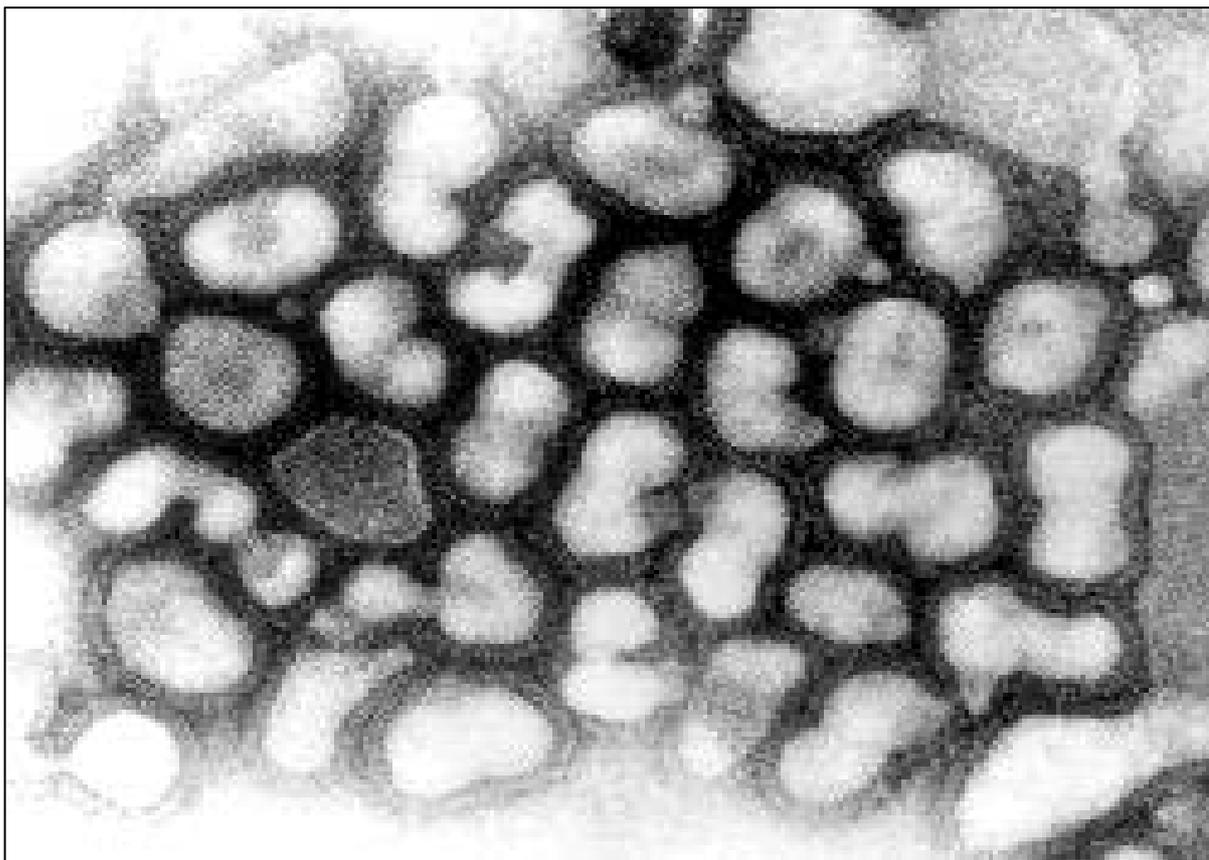


Figura nº. 5- Micrografia eletrônica de transmissão de coloração negativa. - Vírus Influenza. (Fonte: Dr. Erskine Palmer, CDC).

3. DOENÇA DE NEWCASTLE

3.1. Introdução

A Doença de Newcastle (DN) possui etiologia viral e é uma das enfermidades mais temidas pelos avicultores, devido à alta morbidade e mortalidade, com conseqüentes perdas econômicas, sendo classificada como uma doença da lista A da OIE (<http://www.oie.int/22/04/2002>). Existem diferentes tipos de vírus que podem determinar variações na severidade da enfermidade, que podem confundir-se com outras patologias que se manifestam de forma semelhante, como por exemplo, a influenza aviária. O vírus é capaz de afetar o trato respiratório, digestivo e o sistema nervoso (Noguera, 2003).

A doença é caracterizada por apresentar uma acentuada variação na morbidade, mortalidade, sintomas e lesões, acometendo usualmente galinhas e com menor freqüência perus. Contudo várias espécies de aves são susceptíveis nas diferentes faixas etárias, o que a torna uma das mais importantes doenças das aves domésticas (Whiteman, 1989).

3.2. Vírus da Doença de Newcastle

3.2.1. Classificação

Integrante da família *Paramyxoviridae*, o Vírus da Doença de Newcastle (VDN) pertence ao gênero *Rubulavírus*, possuindo genoma ARN. Existem 9 sorotipos de *paramyxovírus* de aves designados de AMPV-1 à AMPV-9, sendo o VDN o sorotipo 1, ou seja, AMPV-1 (Carter *et al.*, 2005).

Dependendo da virulência do agente, a DN pode manifestar-se em diferentes graus de severidade que variam desde uma infecção subclínica, onde os sintomas são inaparentes ou discretos, até uma doença fatal que aparece repentinamente e resulta em alta mortalidade das aves. Testes de inoculação em pintos de um dia permitem caracterizar e classificar o VDN em cinco patótipos. Por patótipo entende-se o grau de patogenicidade do vírus e, portanto, a severidade da doença causada por determinada cepa do vírus. (Quadro 3)

Quadro nº. 3 - Patótipos do VDN.

<i>Classificação</i>	<i>Forma</i>	<i>Sintomas</i>	<i>Patogenicidade</i>	<i>Observações</i>
1- Viscerotrópico e velogênico	Doyle	Apatia, diarreia esverdeada e lesões hemorrágicas intestinais	Alta	Elevada mortalidade em galinhas
2- Neurotrópico e velogênico	Beach	Espirros, corrimento nasal, ruído dos pulmões, edema de cabeça e face, torcicolo, paralisia das pernas e tremores musculares	Alta	Mortalidade pode chegar a 100% das aves
3- Mesogênico	Beaudette	Respiratórios leves, queda de postura em poedeiras e eventualmente sintomas nervosos	Leve	Baixa mortalidade e mais comum em aves jovens
4- Lentogênico	Hitchner	Respiratórios brandos	Leve	Usados como cepas vacinais
5- Entérico assintomático	Assintomática	Não causa sintomas ou lesões nas aves	Não patogênico	Usados como cepas vacinais

Logo, considerando o quadro acima, nem todas as cepas do VDN causam doença (MAPA, 2006).

3.2.2. Morfologia

Os *paramyxovirus* são altamente pleomórficos, sendo observadas variações nas formas entre esféricas e filamentosas (Carter *et al*, 2005). Geralmente são esféricas e com um diâmetro variando entre 100 e 500 nanômetros (nm), embora formas filamentosas com cerca de 100 nm de comprimento sejam vistas com frequência (Alexander, 2003 *in* Saif, 2003)

3.2.3. Estrutura e Composição Química

O VDN é formado por molécula de RNA de fita simples, com peso molecular aproximado de 5×10^6 , a qual corresponde a 0,5% do peso da partícula viral, partícula esta que apresenta cerca de 6% de carboidratos, além de 20 a 25% de lipídios derivados da célula hospedeira. Com um genoma codificando cerca de seis diferentes proteínas, o VDN revela-se muito pleomórfico, sendo esta uma característica típica das partículas virais pertencentes ao gênero *Rubulavírus*.

As proteínas codificadas são assim representadas: L – associada ao nucleocapsídeo, tem ação direcionada a RNA polimerase, HN - responsável pelas atividades de hemaglutinina e neuraminidase, M – matriz, P- fosforilado associado a nucleocapsídeo, F- pequenas projeções superficiais também denominadas de proteínas de fusão e o NP- nucleocapsídeo (Alexander,2003 *in* Saif, 2003).

3.2.4. Resistência e inativação

O VDN é inativado pelo pH ácido, assim como pela formalina e pelo fenol, sendo sensível também ao éter. Quando submetido à temperatura de 56°C por 3 horas ou 60°C por 30 minutos o vírus torna-se inativo, contudo é capaz de sobreviver por longos períodos em temperatura ambiente, especialmente quando nas fezes (<http://www.oie.int/> 22/04/2002).

3.2.5. Ocorrência

A DN é relativamente comum, vindo a se tornar endêmica em muitos países do mundo e ocorrendo em todos os países criadores de aves domésticas. Todas as faixas etárias são susceptíveis, ocorrendo usualmente em galinhas e com menor frequência em perus. Alguns países da Europa têm permanecido livres por anos (OIE, 2001).

3.2.6. Epidemiologia

Dentre as várias espécies de aves domésticas e silvestres que podem ser acometidas por este *paramyxovírus*, as galinhas são, dentre as domésticas as mais susceptíveis. Desta forma superando patos e gansos.

Uma condição de portador pode acontecer entre as aves silvestres, fato que também pode ser observado em alguns membros da família psitacéida.

As taxas de morbidade e de mortalidade variam em função da espécie acometida e da virulência da cepa viral envolvida.

3.2.7. Fonte de infecção e modo de transmissão

Secreções do trato respiratório, fezes e carcaças são verdadeiras fontes de infecção. Contudo é fato que alguns pássaros permanecem eliminando o agente de forma intermitente, por intervalos maiores de um ano, como observado em alguns psitacédeos. As secreções do trato digestivo também são importantes fontes de infecção, devido à possibilidade de replicação nas mesmas (Noguera, 2003).

A transmissão ocorre através do contato direto com secreções e fezes de pássaros infectados, bem como através da água, alimentos, fômites, roupas etc, que estejam contaminados (OIE - Organización Mundial de Sanidad Animal <http://www.oie.int/> 2002).

3.2.8. Sinais Clínicos

Nos homens

Humanos são ocasionalmente infectados, resultando em doença branda, similar a influenza, apresentando sintomas de conjuntivite (Carter *et al.*, 2005), sendo a doença na maioria das vezes unilateral com curso aproximado de uma semana. Em alguns casos podem ocorrer edema e hemorragia subconjuntival.

Nos animais

O período de incubação é de aproximadamente cinco dias antes do aparecimento dos primeiros sintomas. Dentre os sinais apresentados podemos destacar: tosse, falta de ar, descarga nasal, diarreia verde aquosa, depressão, tremor muscular, asas caídas, paralisia

completa, baixa na produção de ovos, edema ao redor dos olhos e morte repentina (<http://www.cdfa.ca.gov/2006>).

A severidade dos sintomas está relacionada com a cepa e a quantidade do vírus atuante, estado imunológico da ave, grau de exposição, presença de outros agentes infecciosos e condições ambientais. Nos casos agudos pode ocorrer mortalidade sem outras manifestações clínicas, contudo aves que morrem na fase aguda da doença podem apresentar diarreia esverdeada, torcicolo, tremores musculares e paralisia das asas e patas.

Na forma nervosa existem transtornos respiratórios severos seguidos de sintomas nervosos, queda na produção de ovos e geralmente ausência de quadros gastrintestinais; com a morbidade podendo alcançar 100% e a mortalidade até 90% em aves jovens e até 50% em adultos.

Em surtos de campo causados por cepas menos patógenas, podem ser gerados quadros respiratórios e queda na produção de ovos que podem durar várias semanas, com mortalidade geralmente baixa, exceto em aves susceptíveis muito jovens.

Quando a enfermidade é causada por cepas altamente patógenas, se observa dispnéia, tristeza, debilidade, prostração e morte, a qual pode alcançar 100% dos casos (Noguera, 2003).

3.2.9. Lesões

A presença e severidade das lesões estão relacionadas aos diferentes fatores citados com ação direta sobre os sinais clínicos e conseqüentemente sobre as lesões. Dentre a variedade de lesões que a enfermidade pode apresentar em função de suas diferentes formas, podemos citar:

- Edema do tecido intersticial ou peritraqeal da garganta, principalmente na entrada torácica.

- Congestão e hemorragia na mucosa traqueal

- Petéquias e equimoses na entrada do próventrículo, concentrada em torno dos orifícios das glândulas mucosas

- Edema, hemorragia, necrose ou ulceração do tecido linfóide na mucosa da parede intestinal

- Edema, hemorragia ou degeneração dos ovários, etc.

Nenhuma lesão macroscópica é considerada patognomônica, devendo-se examinar vários pássaros na tentativa de diagnosticar a enfermidade, sendo que o diagnóstico final deve aguardar o isolamento e a identificação do vírus.

A presença de lesões hemorrágicas no trato intestinal é um critério que se tem empregado para diferenciar as cepas velogênicas-viscerotrópicas das neurotrópicas, e estas lesões são frequentemente no próventrículo, cecos, cloaca, tonsilas cecais e demais áreas do trato intestinal.

Em aves de postura se observam ovos flácidos e degenerados, hemorragias e palidez de outros órgãos reprodutores e retenção de ovos na cavidade abdominal (Noguera, 2003).

3.2.10. Diagnóstico

O diagnóstico clínico baseado no histórico, sintomas e lesões podem estabelecer um forte indicador de suspeita, uma vez que a DN tenha sido identificada positivamente em uma área, contudo a confirmação laboratorial deverá sempre ser buscada.

O isolamento usualmente é realizado em embriões de galinha e para identificação alguns testes são considerados de grande utilidade, como por exemplo, a hemaglutinação, a inibição da hemaglutinação e a vírus neutralização (Whiteman, 1989).

3.2.11. Profilaxia e Controle

A profilaxia e controle da DN consistem, dentre outras ações, na adoção das seguintes medidas:

- > Isolamento do surto
- > Sacrifício das aves infectadas e expostas
- > Limpeza e desinfecção das instalações
- > Eliminação apropriada das carcaças
- > Manter as instalações vazias por pelo menos 21 dias antes de reintroduzir novas aves
- > Controle do tráfego humano
- > A vacinação pode reduzir de forma acentuada as perdas nos plantéis de aves domésticas

3.2.12. Impacto Sócio-Econômico

É grande o impacto sofrido diante da presença de um foco da doença, isto ocorre em função de diversos fatores tais como:

- > Restrição à exportação de frangos de corte e outros produtos de origem avícola.

- > Interrupção ou acentuada queda de postura.
- > Morbidade e mortalidade elevadas quando diante da forma patogênica.
- > Deterioração da qualidade interna e externa dos ovos.
- > Redução da fertilidade e da eclodibilidade.
- > Comprometimento dos parâmetros zootécnicos.

O VDN provoca perdas econômicas globais realmente elevadas. Nos países desenvolvidos, onde a indústria avícola encontra-se estabelecida, não são apenas os surtos de VDN extremamente dispendiosos, mas também as medidas de controle, incluindo vacinações, que representam um alto custo permanente para indústria (Leslie, 2000).

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Vírus.

Foram utilizadas amostras de Vírus Influenza A/Eq/Rio de Janeiro/23/01 (H3N8) procedentes do Laboratório de Viroses Veterinárias (LVV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), e amostras vacinais (La Sota) do vírus da doença de Newcastle.

4.1.2. Fezes.

Foram analisadas 322 amostras de fezes frescas, de pombos (*Columba livia doméstica*), coletadas diretamente no solo, procedentes de largos e praças públicas do município do Rio de Janeiro.

Ao coletarmos as amostras, utilizadas neste trabalho, procuramos trabalhar com uma distribuição representativa nas diferentes áreas da cidade.

Para tanto foram escolhidos locais com importante potencial para transmissão dos referidos agentes patógenos, quer pela grande quantidade de pombos, bem como pelo trânsito elevado de pessoas nos mesmos (Anexo 6). Consideramos também áreas com trânsito potencial de turistas como, por exemplo, Largo do Machado, Cinelândia, Maracanã, Praia de Botafogo e Praça Mauá.

4.1.3. Solução Salina Tamponada, pH 7.2 (PBS).

Para a diluição das amostras, bem como para a realização das provas de HA utilizou-se a solução salina tamponada, pH 7.2 assim composta:

- Cloreto de sódio (NaCl)	8,00 g
- Cloreto de potássio (KCl)	0,20 g
- Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)	1,13 g
- Fosfato bipotássico (K ₂ HPO ₄)	0,20 g
- Água destilada q.s.p.	1000,00 mL

Ajustar para pH 7.2 e autoclavar a 115°C durante 10 minutos.

4.1.4. Ácido Citrato Dextrose (A.C.D.).

O A.C.D. utilizado como anti-coagulante de escolha para a coleta das hemácias de galinha apresentava a seguinte composição:

- Glicose (Dextrose – C ₆ H ₁₂ O ₆)	11,00 g
- Citrato de sódio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂)	11,26 g
- Ácido Cítrico (C ₆ H ₈ O ₇)	4,00 g
- Água destilada deionizada q.s.p.	500,00 mL

Autoclavar a 115°C por 10 minutos.

4.1.5. Hemácias de galinha.

Foram colhidas assepticamente, dos plantéis de aves doadoras do Laboratório de Biologia Animal (LBA) da Pesagro/Rio de Janeiro e da Granja Tolomei®, em A.C.D., utilizando-se a proporção de 1,5 mL do anti-coagulante para 8,5 mL de sangue. Tais aves eram livres de anticorpos para influenza, Newcastle e também para micoplasma.

4.1.6. Microplacas, Pipetadores / Diluidores e Ponteiras.

Nas provas de HA foram utilizadas microplacas de 96 poços com fundo em “U”, pipetadores/diluidores automáticos mono e multicanal, de 25 microlitros, com ponteiras descartáveis.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Cálculo do número amostral

Quando se pesquisa grandes populações, ou as teoricamente chamadas populações infinitas, utiliza-se a seguinte fórmula (Thrusfield, 2003):

$$n = 1,96^2 \times P_{\text{esp}} (1 - P_{\text{esp}}) / d^2$$

Onde

n = é o tamanho da amostra;

P_{esp.} = é a prevalência esperada e

d = Precisão desejada absoluta.

Contudo, ao considerarem-se populações relativamente menores que as teoricamente infinitas, é possível selecionar-se uma amostra de tamanho reduzido, mantendo o mesmo grau de precisão, através da fórmula abaixo (Thrusfield, 2003):

$$n_{aj} = (N \cdot n) / (N + n)$$

Onde

n_{aj} = amostra ajustada

N = população estimada

Foi considerado neste trabalho, que o total de pombos existente nas áreas onde foram coletadas as amostras é de aproximadamente 2000 animais. Tal estimativa baseou-se em contagens realizadas em cada ponto de coleta em pelo menos duas diferentes datas, no momento em que estas aves eram alimentadas. Com um nível de confiança de 95% e precisão absoluta desejada de 5%, foi utilizada uma prevalência de 50%, por não conhecermos as prevalências das doenças aqui pesquisadas, o que nos forneceu um valor tabelado de $n = 384$. Assim sendo, aplicados os referidos valores, obtivemos:

$$n_{aj} = (2000 \cdot 384) / (2000 + 384) : 768000/2384 = 322,14$$

Portanto foram utilizadas 322 amostras.

4.2.2. Coleta de Amostras

Os principais sítios de replicação do VIA são os tratos respiratório e digestivo, justificando assim, a coleta de amostras de fezes como material de eleição para a realização deste trabalho. Foram coletadas, diretamente do solo, fezes frescas de pombos de vida livre encontrados em praças públicas do município do Rio de Janeiro. No intuito de obter amostras representativas, dividiu-se a cidade em quatro zonas, foram elas: centro, oeste, norte e sul. Em cada zona foram escolhidas praças públicas que apresentassem grande densidade e/ou movimentação de pessoas (Anexo 6), bem como uma elevada população de pombos. Aspectos como pontos de alta circulação de turistas e eixos viários (rodoviário, metroviário e ferroviário) também foram considerados (Anexo 7). Outros fatores mais relacionados ao momento da coleta foram avaliados, como a necessidade de alimentação dos pombos para facilitar o processo; a escolha de uma área considerada mais “limpa” para obtenção das amostras; a definição dos melhores dias e horários, levando-se em conta o comportamento destas aves.

4.2.3. Pontos de Coleta de Amostras

Considerando os aspectos citados na descrição dos tópicos, cálculo do número amostral e coleta de amostras, foram visitados 11 largos e praças públicas, das quais totalizamos 322 amostras coletadas, conforme descrito no quadro a seguir:

Quadro nº. 4 - Pontos de Coleta de Amostras

Zona	Localidade	Latitude	Longitude	Nº.de Amostras
1-Centro	I - Cinelândia	<i>S 22°54'49.9"</i>	<i>W 43°10'39.7"</i>	23
"	II - Praça Tiradentes	<i>S 22°54'23.7"</i>	<i>W 43°10'52.2"</i>	25
"	III - Praça Mauá	<i>S 22°53'47.0"</i>	<i>W 43°10'53.7"</i>	26
2-Norte	IV - Praça Saens Pena	<i>S 22°59'29.6"</i>	<i>W 43°13'56.4"</i>	30
"	V - Maracanã 1	<i>S 22°54'46.5"</i>	<i>W 43°14'04.5"</i>	26
"	VI - Pavuna 2	<i>S 22°48'20.7"</i>	<i>W 43°21'52.0"</i>	24
3-Sul	VII - Praia de Botafogo	<i>S 22°56'53.1"</i>	<i>W 43°10'56.0"</i>	38
"	VIII - Largo da Glória	<i>S 22°55'11.2"</i>	<i>W 43°10'33.7"</i>	33
"	IX - Largo do Machado	<i>S 22°55'49.3"</i>	<i>W 43°10'45.2"</i>	24
4-Oeste	X - Santa Cruz 3	<i>S 22°55'34.0"</i>	<i>W 43°41'25.8"</i>	30
"	XI - Campo Grande 4	<i>S 22°54'21.2"</i>	<i>W 43°33'43.1"</i>	43
				Tt = 322

1- Ao redor do Estádio Mário Filho; 2- Praça Copérnico; 3- Largo do Bodegão; 4- Praça Dom João Esberard

Amostras Coletadas

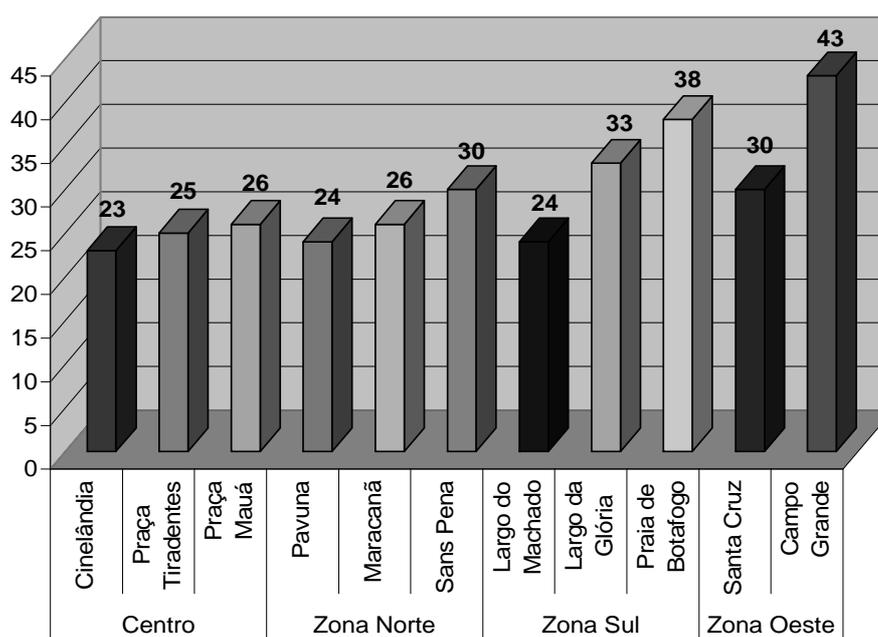


Gráfico 2 - Pontos de Coleta x Amostras Coletadas

Todo o material coletado foi acondicionado em frascos, mantido sob refrigeração e conduzido o mais rápido possível ao laboratório onde foi estocado a -20°C , até o momento de uso (Brasil-MAARA, 1994).

4.2.4. Tratamento das amostras

As amostras foram pesadas, diluídas na proporção de uma parte da amostra para quatro partes de PBS, homogeneizadas em vórtex e posteriormente centrifugadas. Após o recolhimento dos sobrenadantes e reidentificação das amostras passamos a descontaminação das mesmas, através da adição de antibióticos e fungicida (penicilina, estreptomicina e fungizona respectivamente). A concentração final utilizada nas amostras foi de 800 U.I./mL de penicilina, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de fungizona. O precipitado obtido durante a centrifugação foi devidamente identificado e estocado à -20°C

4.2.5. Inoculação em ovos embrionados

Uma alíquota de 0,2mL do sobrenadante tratado de cada amostra foi inoculada via cavidade alantóica, em ovos embrionados SPF, com 10 -12 dias de incubação.

Os ovos inoculados foram mantidos por mais 72 horas incubados a 33°C , para favorecer o desenvolvimento do VIA, quando então os embriões foram resfriados a 4°C e o líquido alantóico foi coletado (Manuguerra, 1999).

Paralelamente a este procedimento, uma outra bateria de ovos inoculados foi incubada a 37°C para favorecer o desenvolvimento do VDN.

Para maior eficácia todo o material testado foi inoculado em duplicata. Ovos embrionados não inoculados foram utilizados como controle.

Nesta prova utilizamos ovos cedidos pela Granja Tolomei®, sendo estes livres de anticorpos para os vírus aqui pesquisados, bem como de micoplasma.

Quadro nº. 5 – Inoculação material centro - I

Região de Origem	Local e nº de amostras	Amostras (pool) incubadas a 33°C					Amostras (pool) incubadas a 37°C				
		Pool.1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am	Pool 1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am
I	Ci (23)	Ci.1a/5	Ci.2a/5	Ci.3a/5	Ci.4a/4	Ci.5a/4	Ci.1a/5	Ci.2a/5	Ci.3a/5	Ci.4a/4	Ci.5a/4
		Ci.1b/5	Ci.2b/5	Ci.3b/5	Ci.4b/4	Ci.5b/4	Ci.1b/5	Ci.2b/5	Ci.3b/5	Ci.4b/4	Ci.5b/4
	Ti (25)	Ti.1a/5	Ti.2a/5	Ti.3a/5	Ti.4a/5	Ti.5a/5	Ti.1a/5	Ti.2a/5	Ti.3a/5	Ti.4a/5	Ti.5a/5
		Ti.1b/5	Ti.2b/5	Ti.3b/5	Ti.4b/5	Ti.5b/5	Ti.1b/5	Ti.2b/5	Ti.3b/5	Ti.4b/5	Ti.5b/5
	Mu (26)	Mu.1a/5	Mu.2a/5	Mu.3a/5	Mu.4a/5	Mu.5a/6	Mu.1a/5	Mu.2a/5	Mu.3a/5	Mu.4a/5	Mu.5a/6
		Mu.1b/5	Mu.2b/5	Mu.3b/5	Mu.4b/5	Mu.5b/6	Mu.1b/5	Mu.2b/5	Mu.3b/5	Mu.4b/5	Mu.5b/6

=> Cinelândia (Ci); Praça Tiradentes (Ti) ; Praça Mauá (Mu)

Quadro nº.6 – Inoculação material zona oeste - II

Região de Origem	Local e nº de amostras	Amostras (pool) incubadas a 33°C					Amostras (pool) incubadas a 37°C				
		Pool 1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am	Pool 1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am
II	CG (43)	CG.1a/9	CG.2a/9	CG.3a/9	CG.4a/8	CG.5a/8	CG.1a/9	CG.2a/9	CG.3a/9	CG.4a/8	CG.5a/8
		CG.1b/9	CG.2b/9	CG.3b/9	CG.4b/8	CG.5b/8	CG.1b/9	CG.2b/9	CG.3b/9	CG.4b/8	CG.5b/8
	SC (30)	SC.1a/6	SC.2a/6	SC.3a/6	SC.4a/6	SC.5a/6	SC.1a/6	SC.2a/6	SC.3a/6	SC.4a/6	SC.5a/6
		SC.1b/6	SC.2b/6	SC.3b/6	SC.4b/6	SC.5b/6	SC.1b/6	SC.2b/6	SC.3b/6	SC.4b/6	SC.5b/6

=> Santa Cruz - Largo do Bodegão-(SC); Campo Grande - Praça Dom João Esberard -(CG)

Quadro nº.7 – Inoculação material zona sul - III

Região de Origem	Local e nº de amostras	Amostras (pool) incubadas a 33°C					Amostras (pool) incubadas a 37°C				
		Pool 1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am	Pool 1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am
III	LM (24)	LM1a/5	LM2a/5	LM3a/5	LM4a/5	LM5a/4	LM1a/5	LM2a/5	LM3a/5	LM4a/5	LM5a/4
		LM1b/5	LM2b/5	LM3b/5	LM4b/5	LM5b/4	LM1b/5	LM2b/5	LM3b/5	LM4b/5	LM5b/4
	Gó (33)	Gó1a/7	Gó2a/7	Gó3a/7	Gó4a/6	Gó5a/6	Gó1a/7	Gó2a/7	Gó3a/7	Gó4a/6	Gó5a/6
		Gó1b/7	Gó2b/7	Gó3b/7	Gó4b/6	Gó5b/6	Gó1b/7	Gó2b/7	Gó3b/7	Gó4b/6	Gó5b/6
	Bo (38)	Bo1a/8	Bo2a/8	Bo3a/8	Bo4a/7	Bo5a/7	Bo1a/8	Bo2a/8	Bo3a/8	Bo4a/7	Bo5a/7
		Bo1b/8	Bo2b/8	Bo3b/8	Bo4b/7	Bo5b/7	Bo1b/8	Bo2b/8	Bo3b/8	Bo4b/7	Bo5b/7

=> Largo do Machado (LM); Largo da Glória (Gó); Praia de Botafogo (BO)

Quadro nº.8 – Inoculação material zona norte - IV

Região e Origem	Local e nº de amostras	Amostras (pool) incubadas a 33°C					Amostras (pool) incubadas a 37°C				
		Pool 1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am	Pool 1 /nº am	Pool 2 /nº am	Pool 3 /nº am	Pool 4 /nº am	Pool 5 /nº am
IV	Pa (24)	Pa1a/5	Pa2a/5	Pa3a/5	Pa4a/5	Pa5a/4	Pa1a/5	Pa2a/5	Pa3a/5	Pa4a/5	Pa5a/4
		Pa1b/5	Pa2b/5	Pa3b/5	Pa4b/5	Pa5b/4	Pa1b/5	Pa2b/5	Pa3b/5	Pa4b/5	Pa5b/4
	SP (30)	SP1a/6	SP2a/6	SP3a/6	SP4a/6	SP5a/6	Sp1a/6	SP2a/6	SP3a/6	SP4a/6	SP5a/6
		SP1b/6	SP2b/6	SP3b/6	SP4b/6	SP5b/6	SP1b/6	SP2b/6	SP3b/6	SP4b/6	SP5b/6
	Mn (26))	Mn1a/5	Mn2a/5	Mn3a/5	Mn4a/5	Mn5a/6	Mn1a/5	Mn2a/5	Mn3a/5	Mn4a/5	Mn5a/6
		Mn1b/5	Mn2b/5	Mn3b/5	Mn4b/5	Mn5b/6	Mn1b/5	Mn2b/5	Mn3b/5	Mn4b/5	Mn5b/6

=> Pavuna - Praça Copérnico-(Pa); Praça Saens Pena (SP); Maracanã – ao redor do estádio (Mn)

4.2.6. Prova de hemaglutinação (HA) e Inibição da Hemaglutinação (HI)

4.2.6.1. Prova de hemaglutinação.

Para determinação do título hemaglutinante dos líquidos alantóicos coletados foram realizadas diluições múltiplas de 2, em PBS, pH 7,2, frente a hemácias de galinha, em microplacas de 96 poços com fundo em “U”.

As microplacas foram incubadas em temperatura ambiente (± 25 °C) durante 60 minutos, quando então foram realizadas as leituras (Andrade, 1999).

O título de uma unidade hemaglutinante (1 UHA) foi definido a partir da maior diluição do líquido alantóico capaz de exercer atividade hemaglutinante completa. A reação de HA foi realizada em duplicata para cada amostra testada.

Nos casos onde o teste de HA não indicou a presença de vírus hemaglutinante nos líquidos alantóicos coletados, estes sofreram, pelo menos, uma passagem cega e novo teste de HA, para confirmação (Brasil-MAARA, 1994).

Foram utilizadas amostras de Vírus Influenza A/Eq/Rio de Janeiro/23/01 (H3N8) e amostras vacinais (La Sota) do Vírus da Doença de Newcastle como controles positivos.

Nesta fase do trabalho foram utilizadas aves especialmente criadas para doação de hemácias, provenientes de ovos embrionados SPF e soro negativas para VIA, VDN e micoplasma, pertencentes ao plantel do LBA da PESAGRO/RIO.

4.2.6.2. Prova de inibição da hemaglutinação.

Em função das provas de HA não terem apresentado atividade hemaglutinante para os líquidos alantóicos coletados, as provas de HI não foram realizadas, ocorrendo apenas o teste dos controles, sendo as amostras encaminhadas após a prova HA diretamente para RT-PCR.

4.2.7. Caracterização molecular dos clones virais

As técnicas que envolveram biologia molecular, utilizadas neste trabalho, quando objetivando evidenciar VIA, foram provenientes do protocolo desenvolvido por *Elis & Zambon* (2001). Entretanto, quando o objetivo era evidenciar VDN, as técnicas empregadas foram as do protocolo preconizado por *Pang et al.* (2002).

4.2.7.1. Purificação do RNA viral

Preliminarmente, o líquido alantóico de ovos embrionados, inoculados com as amostras coletadas, passou por um processo de purificação do RNA viral. Para tanto, foi utilizado um “kit” para purificação do RNA viral (QIAamp® Viral RNA Mini Kit Handbook) produzido pela QIAGEN®. Conforme descrito abaixo:

1. Pipetou-se 560 µl do tampão preparado AVL contendo o carreador de RNA em um microtubo de centrifugação de 1,5 mL.
2. Adicionou-se 140 µl da amostra ao tampão preparado AVL contendo o carreador de RNA. Homogeneizou-se em vortex por 15 segundos.
3. Incubou-se em temperatura ambiente (15 - 25 °C) por 10 minutos.
4. Centrifugou-se rapidamente para baixar as prováveis gotas presentes na tampa.
5. Adicionou-se 560 µl de etanol (96 - 100%) à mistura e homogeneizou-se em vortex por 15 segundos.
Em seguida, centrifugou-se rapidamente para baixar as prováveis gotas presentes na tampa.
6. Cuidadosamente aplicou-se 630µl da solução do passo 5 para a coluna de spin do QIAamp (em tubo coletor de 2mL) sem tocar o tubo. Fechou-se a tampa, e centrifugou-se a 6000xg (8000rpm) por 1 minuto. Colocou-se a coluna de spin do QIAamp em um novo tubo coletor de 2 mL, e descartou-se o tubo com o filtrado.
7. Cuidadosamente abriu-se a coluna de spin do QIAamp e repetiu-se o item anterior.
8. Cuidadosamente abriu-se a coluna de spin do QIAamp, e adicionou-se 500 µl de tampãoAW1. Fechou-se a tampa e centrifugou-se a 6000xg (8000rpm) por 1 minuto. Colocou-se a coluna de spin do QIAamp em um novo tubo coletor de 2 mL, e descartou-se o tubo com o filtrado.
9. Cuidadosamente abriu-se a coluna de spin do QIAamp, e adicionou-se 500 µl de tampão AW2. Fechou-se a tampa e centrifugou-se a 20.000xg (14.000rpm) por 3 minutos. Em

seguida transferiu-se a coluna de spin do QIAamp para um novo tubo coletor de 2 mL, e descartou-se o tubo com o filtrado.

10. Colocou-se a coluna de spin do QIAamp em um microtubo de centrifuga de 1,5mL . Descartou-se o antigo tubo com o filtrado. Cuidadosamente abriu-se a coluna de spin do QIAamp, e adicionou-se 60 µl de tampão AVE equilibrado com a temperatura ambiente. Fechou-se a tampa e incubou-se por 1 minuto na mesma temperatura. Centrifugou-se a 6000xg (8000rpm) por 1 minuto.

4.2.7.2. Transcrição Reversa (RT-PCR)

Como área alvo para a identificação viral, foi definida a região conservada do gene da proteína matriz (M), garantindo o diagnóstico amplo de quaisquer estirpes de quaisquer subtipos do Vírus Influenza tipo A. Ensaios para a detecção de seqüências genômicas que codificam as glicoproteínas do envelope têm a vantagem de permitir a classificação quanto ao subtipo (HA e NA) e a desvantagem de resultados falso-negativos, contornáveis em parte pela utilização de iniciadores para os principais subtipos já diagnosticados.

A transcrição reversa foi realizada mediante o seguinte protocolo:

- ◆ Foi preparada a mistura para RT (10 amostras):
 - ◆ 40µL Tampão de PCR 10x
 - ◆ 60µL de MgCl₂ 50mM
 - ◆ 60µL de dNTP
 - ◆ 4µL de Randon primers
 - ◆ 4µL de Rnasin
 - ◆ 10µL de MMLV Rtase

Posteriormente, foram distribuídos 17,8µL em tubos para PCR de 200µL. Adicionou-se então, 22,2µL de RNA eluido anteriormente e incubou-se à 25 °C por 10minutos, 42°C por 1 hora e em seguida por 5min a 95°C. O cDNA produzido foi conservado à -20 °C até a realização da primeira PCR.

4.2.7.3. Primeira PCR

A primeira PCR foi realizada mediante o seguinte protocolo:

- ◆ Preparou-se a mistura para a 1^aPCR (10 reações):
 - ◆ 80µL de tampão de PCR 10x
 - ◆ 20µL de MgCl₂

- ◆ 10µL de cada um dos primers externos
- ◆ 637µL de H₂O
- ◆ 3µL de Taq polimerase

Posteriormente, foram distribuídos 80µL desta mistura em tubos para PCR de 200µL. Adicionou-se então 20µL do cDNA gerado na reação de RT e executou-se o seguinte programa no termociclador: 94°C/2 min e realizados 30 ciclos de 94°C/1min e 68°C/1min. O produto gerado foi conservado à -20 °C até a realização da segunda PCR.

Os iniciadores externos, que correspondem a uma fração do gene da proteína M, utilizados nesta reação foram os seguintes:

- ◆ AMP 71F 5' - CCG TCA GGC CCC CTC AAA GC - 3'
- ◆ AMP 831R 5' - AGG CGA TCA AGA ATC CAC AA - 3'

4.2.7.4. Segunda PCR

A segunda PCR foi realizada mediante o seguinte protocolo:

- ◆ Preparou-se a mistura para a 2ª PCR (10 reações):
- ◆ 50µL de tampão de PCR 10x
- ◆ 10µL do mix de dNTP
- ◆ 25µL de MgCl₂
- ◆ 10µL de cada um dos primers internos
- ◆ 333,5µL de H₂O
- ◆ 1,5µL de Taq polimerase

Posteriormente, foram distribuídos 48µL desta mistura em tubos para PCR de 200µL. Adicionou-se então 2,0µL do produto da 1ª reação de PCR e executou-se o seguinte programa no termociclador: 94°C/2min e realizados 30 ciclos de 94°C/1min, 68°C/1min e 72°C/1min. O produto gerado foi conservado à -20 °C até a realização da segunda PCR.

Os iniciadores internos, que também correspondem a uma fração do gene da proteína M, utilizados nesta reação foram os seguintes:

- ◆ AMP 227F 5' - GTGCCAGTGAGCGAGGAC - 3'
- ◆ AMP 622R 5' - ATCTCCATGGCCTCTGCT - 3'

4.2.7.5. Eletroforese em gel de agarose

A visualização dos produtos da segunda PCR foi realizada em um gel de agarose à 1,5%, em tampão de corrida TBE. A corrida foi realizada utilizando-se 100 volts durante uma hora e trinta minutos. No preenchimento dos poços foram utilizados 15µL do produto final da reação, adicionado de 2µL de tampão de aplicação em gel e feita a eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em TBE 1x.

Após a corrida, o gel permaneceu imerso em solução de brometo de etídeo à 0,1% por um período de 5-10 min, foi lavado em água destilada para retirar o excesso de brometo e observado em transiluminador UV de ondas curtas para a visualização das bandas (Wright *et al*, 1995). O tamanho esperado da banda produzida na segunda PCR para VIA foi de aproximadamente 400 pares de base (pb).

Conforme mencionado, quando se objetivou a visualização do VDN, o protocolo utilizado foi o preconizado por Pang *et al*. 2002, com ele utilizamos os primers iniciadores New A 5'-GTCAACATATACACCTCATC-3' e New S 5'-GGAGGATGTTGGCAGCATT-3' e após o cumprimento das etapas de desnaturação, transcrição reversa e PCR, com seus ciclos específicos, apresentou como tamanho esperado da banda produzida, aproximadamente 324 pb.

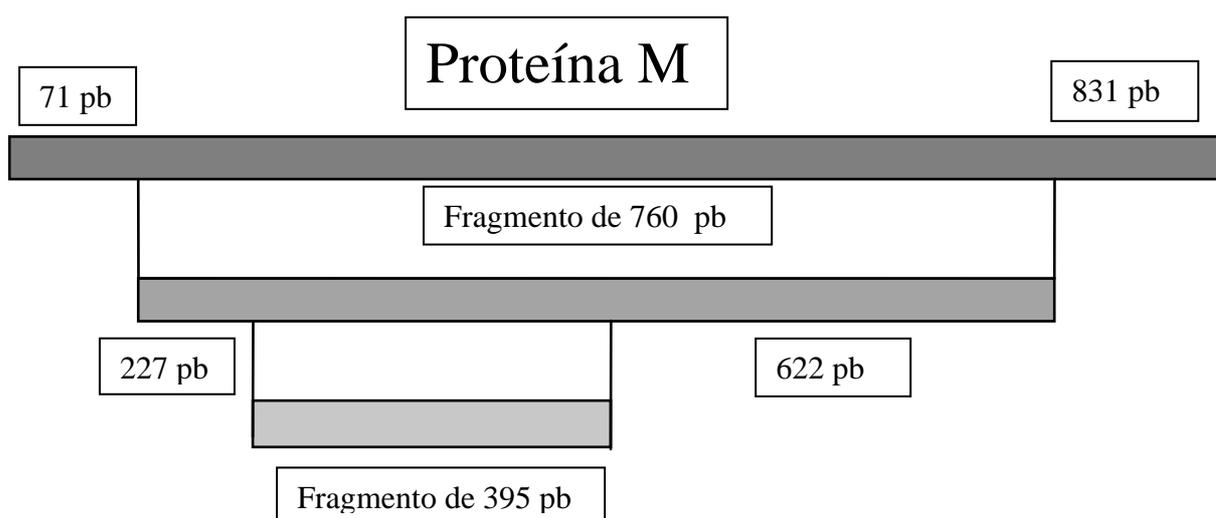


Figura nº. 6. Representação esquemática de fragmentos da Proteína M (iniciadores externos e internos).



Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para diagnóstico de VDN.

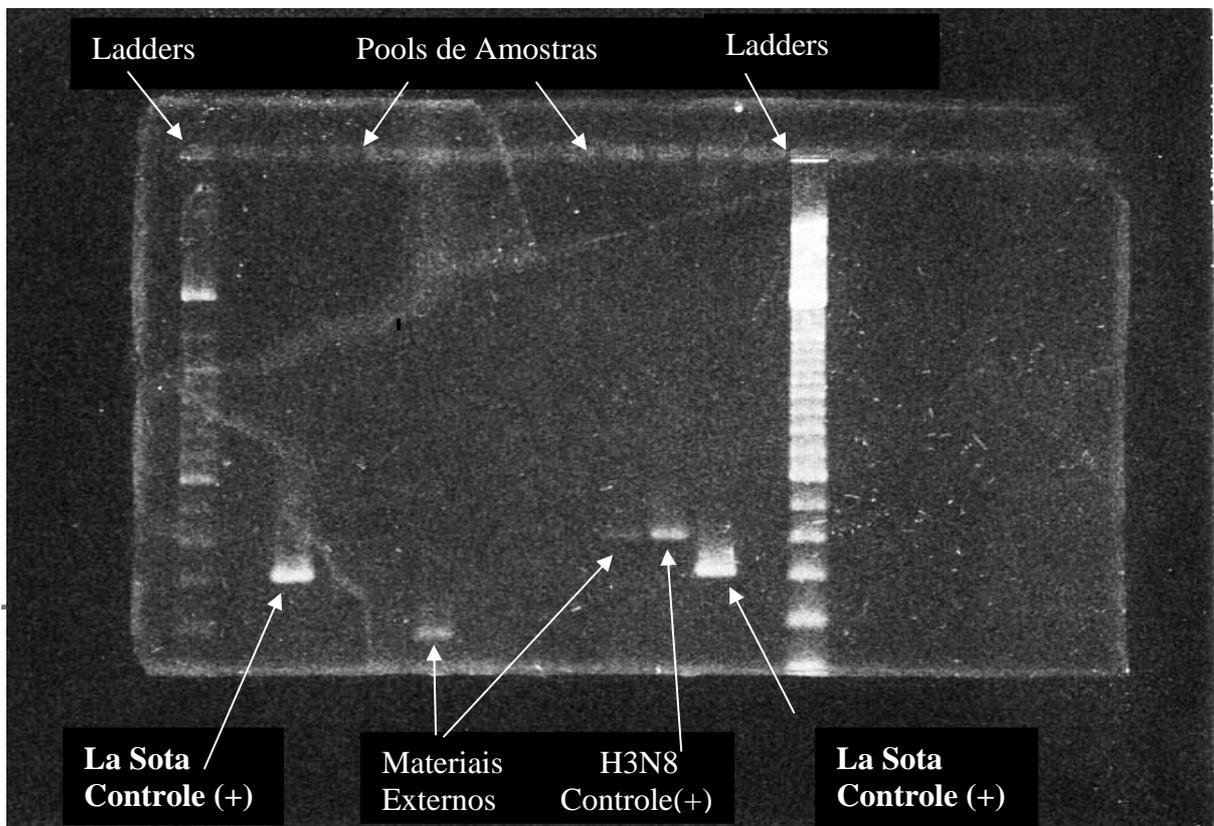


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para diagnóstico de VIA/VDN.

5. OBJETIVOS

5.1. Gerais

A - Verificar a presença de VIA e VDN entre as populações de pombos estudadas, na cidade do Rio de Janeiro.

B - Avaliar a importância dos pombos na transmissão de VIA e VDN na cidade do Rio de Janeiro

C - Fornecer informações para controle epidemiológico das referidas enfermidades

5.2. Específicos

A - Isolamento de amostras do VIA e VDN, a partir de fezes de pombos de vida livre.

B - Avaliação epidemiológica da presença do VIA e do VDN nas regiões pesquisadas

6. LOCAL E INFRAESTRUTURA PARA REALIZAÇÃO DO TRABALHO

O trabalho de tese foi realizado nas dependências do Laboratório de Biologia Animal da PESAGRO/Rio de Janeiro, com a orientação do Dr. Cláudio de Moraes Andrade.

6.1. Laboratório Biologia Animal da Pesagro/Rio de Janeiro (LBA)

No LBA contamos com equipamentos e condição necessária para o cultivo do vírus em ovos embrionados, prova de HA e HI, cultivo celular e biologia molecular, entre outras técnicas microbiológicas. As técnicas virológicas utilizadas fazem parte da rotina estabelecida no LBA.

7. RESULTADOS

Todas as 322 amostras após serem inoculadas em ovos embrionados, e sofrerem passagens cegas, foram testadas pelas técnicas de HA e PCR tendo sido consideradas negativas tanto para presença do vírus da influenza A, como para a presença do vírus da doença de Newcastle.

8. DISCUSSÃO

Ultimamente vivemos dias de apreensão com a possibilidade de ocorrência de uma nova pandemia de influenza, bastando que algum subtipo do Vírus Influenza aviário de alta patogenicidade, adquira a capacidade de ser transmitido de homem para homem. Tal vírus desde 2003 até a presente data já levou ao óbito pelo menos 151 pessoas (OMS, <http://who.int/csr/don/2006> .- Atualizado em 16/10/2006). Associado a tal expectativa, existe o sério risco que a influenza aviária e a doença de Newcastle representam para a avicultura no mundo. Na doença de Newcastle velogênica viscerotrópica, por exemplo, as taxas de morbidade e mortalidade fazem com que tal patologia seja considerada, provavelmente, a mais importante enfermidade na avicultura (Callis *et al.*, 1988), trazendo enormes perdas econômicas, pois além das citadas morbidade e mortalidade geradas, os custos aumentam com a necessidade de sacrificar as demais aves do plantel e com a posterior destruição das carcaças, e os prejuízos continuam com a adoção de medidas de quarentena e vigilância. Associado a todos estes fatores uma conseqüente perda de mercado é praticamente inevitável.

Em outras áreas, apenas a expectativa de uma epidemia já produz reflexos na economia, à medida que importantes ações são adotadas, como por exemplo, o que ocorre na saúde com a aquisição de vacinas e medicamentos anti-virais, com elevados custos e, por vezes, eficiência duvidosa.

Na área de turismo e hotelaria eventos como congressos, reuniões, shows etc. são cancelados gerando também uma queda nas frentes de trabalho. Recentemente o mundo observou com atenção os noticiários, evidenciando uma forte possibilidade do cancelamento da copa do mundo de futebol, a ser realizada na Alemanha (ISTOÉ, 08/03/06), após o país sede ter feito um alto investimento para a realização do evento esportivo.

Surtos de influenza aviária por uma cepa altamente patogênica – A/H5N1 – vêm sendo notificados desde dezembro de 2003 na Ásia e mais recentemente na África, Oriente Médio e Europa. Cepas de influenza aviária usualmente não causam doença em humanos, no entanto, desde 1997, vários casos de transmissão de aves para humanos foram registrados.

A gravidade da doença em humanos pode ser comprovada, quando constatamos que mais da metade dos casos de influenza aviária confirmados por laboratório nos últimos quatro anos, foram fatais (OMS, <http://who.int/csr/don/2006> - Atualizado em 16/10/2006), devendo a mesma ser acompanhada e estudada de perto, considerando sempre o potencial que o vírus tem de evoluir e desta forma iniciar uma pandemia.

A negatividade das amostras para a presença do vírus da influenza e também para o vírus da doença de Newcastle representa que tais agentes não circularam entre as populações estudadas no período que antecedeu a coleta, sendo estas informações importantes ao considerarmos aspectos relacionados à saúde da pública, ao agro negócio e a economia como um todo, principalmente no atual momento, onde existe uma grande expectativa e apreensão por parte da população frente aos episódios de influenza aviária que têm ocorrido no mundo.

Quando consideramos as principais rotas atualmente utilizadas pelas aves migratórias (Fig. nº3), observamos que a possibilidade da HPAI vinda da Ásia chegar ao Brasil através destas aves é remota, bem como sabemos que o Brasil não importa oficialmente aves nem insumos do continente asiático, contudo o deslocamento das pessoas torna-se cada vez maior, em nosso mundo globalizado, e as medidas sanitárias de controle variam muito entre os diferentes países. Entretanto, se considerarmos as rotas migratórias realizadas pelas aves em nosso próprio continente, a situação passa de uma remota possibilidade à uma preocupante realidade, face a reconhecida ocorrência de influenza aviária no Canadá e nos Estados Unidos de onde provêm, os hospedeiros e carreadores naturais do vírus, as aves migratórias. Tal fato se agrava no momento em que estas aves retornam para o hemisfério sul em busca de temperaturas mais amenas, situação observada a partir do mês de setembro. Ao contrário do que acontece em relação aos países da Ásia, existe por parte do Brasil interesse em continuar importando material genético de aves dos Estados Unidos, com quem mantemos uma relação comercial forte bem como um intenso trânsito entre turistas.

Até o presente momento, o Brasil tem mantido a condição de país livre de influenza aviária. Para a manutenção deste *status* sanitário torna-se fundamental um eficaz monitoramento ativo da doença, prática conseguida dentre outros fatores, através de uma intensa atividade de vigilância, tanto em plantéis comerciais quanto em aves migratórias, bem como aplicando os recursos necessários nos serviços oficiais nas áreas de vigilância e defesa sanitária, investindo na rede de laboratórios, estruturando os mesmos de forma a torná-los capazes de atender com qualidade e segurança a uma demanda crescente na rotina de realização de diagnósticos de enfermidades como a influenza aviária e a doença de Newcastle.

Ao avaliarmos um total 322 amostras, de 11 praças distribuídas em quatro regiões da cidade para a presença dos agentes patógenos citados, constatamos que esta negatividade nos diferentes pontos amostrados, representa de forma satisfatória o município alvo da pesquisa, principalmente ao considerarmos a densidade populacional que gira em torno dos pontos de coleta (Quadro 4).

Em que pese à importância dos pombos como transmissores de diversas zoonoses, e ainda que o mundo atravessasse um período crítico, de grande expectativa e apreensão no tocante à disseminação das patologias aqui pesquisadas, a cidade do Rio de Janeiro demonstrou não apresentar tal risco potencial através da população de pombos domésticos estudada, no momento da realização da pesquisa.

Uma investigação sorológica foi realizada, em 1996 por Zhang *et al.*, na região de Lanzhou na China, em 20 espécies de aves raras, tal pesquisa visava a identificação de 16 diferentes doenças infecciosas. Dentre as enfermidades pesquisadas encontrava-se a influenza aviária, para a qual a investigação apresentou resultados negativos.

Pesquisa visando identificar a presença do VIA em faisões, na Itália, foi realizada por Piccirilo *et al.*, no ano de 1998, tendo apresentado resultados negativos.

Toro *et al.*, 1999, pesquisou a existência do vírus da influenza aviária em população de pombos de vida livre na cidade de Santiago no Chile, não tendo observado a presença do VIA nas amostras testadas, entretanto Klopfleisch *et al.*, 2006, confirmou experimentalmente, na Alemanha, que pombos são susceptíveis ao VIA A/chicken/Indonésia/2003 (H5N1) de alta patogenicidade, enquanto Dove *et al.*, 2004, na Slovenia, capturou e examinou 139 pombos para as parasitoses, bacterioses e viroses mais comuns, tendo constatado que apesar de não terem sido observados anticorpos para VIA, a presença de anticorpos para VDN foi verificada em mais de 80% dos indivíduos examinados. Trabalhos como os mencionados, colaboram para reforçar a idéia de que o monitoramento das aves seja de criação, de vida livre ou migratória é de extrema importância em um plano de prevenção da influenza e da doença de Newcastle, contudo tal medida não deve representar nossa maior preocupação com respeito à chegada HPAI no Brasil, pois enquanto as aves migratórias apresentam deslocamentos conhecidos em estações pré-determinadas, o homem no mundo globalizado, não reconhece fronteiras, deslocando-se em qualquer momento para qualquer lugar, favorecendo assim o carreamento e a transmissão dos agentes patógenos.

9. CONCLUSÃO

Não foi verificada a presença de VIA e VDN entre as populações de pombos estudadas, na cidade do Rio de Janeiro.

As regiões representadas pelas praças testadas devem ser consideradas como “Áreas Sentinela” por estarem localizada em locais de grandes aglomerações populacionais e fluxo de milhares de pessoas diariamente.

Convém ressaltar que a coleta das amostras acompanhou os principais eixos viários da cidade, com ênfase para a proximidade com estações ferroviárias e metroviárias e ainda assim, tais agentes não foram constatados no meio.

As amostras testadas foram consideradas negativas para presença do vírus influenza A e vírus da doença de Newcastle nos testes realizados de HA e RT-PCR.

É de fundamental importância a manutenção e o aumento das medidas de monitoramento e de vigilância sanitária, no âmbito das ações de Saúde Pública associadas as da Agricultura, a fim de mantermos o atual *status* sanitário.

No presente momento, a população de pombos domésticos estudada na cidade do Rio de Janeiro, demonstrou não oferecer risco potencial para a transmissão das patologias aqui pesquisadas.

10. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ACHA, P.N. & SZYFRES, B. Influenza. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. Organización Panamericana de la Salud. 2. ed. Washington, D.C.1986. 989p.
- ALEXANDER, D.J. A review of avian influenza in different bird species. **Veterinary Microbiology**. 74, p. 3-13. 2000.
- ALEXANDER, D. J. **Newcastle Disease**; Iowa State Press, p. 64-88. 2003.
- ANDRADE, C. M. Hemaglutinação. **Manual de técnicas de diagnóstico virológico**.1999.p.45-47.
- Atlas Geográfico Mundial. **Américas do Sul e Central e Antártida**. 3ª ed. Editora Sol 90. 3 2005. 96 p.
- BENGIS, R.G. *et al.* The role of wildlife in emerging and re-emerging zoonoses. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, 23(2), p. 497-511. 2004.
- BIER, O. **Bacteriologia e Imunologia**. 16ª ed. Melhoramento Editora - USP. São Paulo.1975. 678 p.
- BRASIL, MAARA. **Programa Nacional de Sanidade Avícola**. Atos Legais, p.83, 1994.
- BRENTANO, L. Influenza (gripe) aviária – Epidemiologia da doença. **In: VII SIMPÓSIO BRASIL SUL DE AVICULTURA**, Chapecó, SC. 2006. p. 154-160.
- CARTER, G.R. *et al.* A Concise Review of Veterinary Virology. **International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org) 2005**. Acessado em 11 de março de 2006.

- CHOPPIN, P. W. *et* COMPANS, R. W. The structure of influenza virus. In: **The influenza viruses and influenza**. Kilbourne, E. D. Academic, Inc. p. 15-51. 1975.
- COLMAN, P. M. 1998. Structure and function of the neuraminidase. In: **NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G. & HAY, A. J. (eds), Textbook of influenza**, Blackwell Science, Oxford, 1988. p. 65-73.
- COUCEIRO, J.N.S.S.; COUCEIRO, E.S.E. & MACHADO, R.D. Circulação simultânea de Myxovírus e Paramyxovírus numa comunidade aviária ornamental. **Rev. Microbiol.** São Paulo, v.18, n.4, p. 375-379, 1987.
- COUCH, R. B. & KASEL, J. A. Influenza In: Couch & Kasel, E.H.; Couch & Kasel, D.A. & Couch & Kasel, E.T. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. **American Public Health Association**. Washington. 7^a ed., 1995.p. 431-445.
- COX, N.J.; FUKUDA, K. Influenza. **Infec. Dis. Clin. Nort. Am.**, v. 12, n. 1, p. 27-38, 1998.
- DOVE, A. *et al.* Health status of free-living pigeons (*Columba livia domestica*) in the city of Ljubljana. **Acta Vet Hung**; v.52, n.2, p.219-26, 2004.
- ELIS, J.S. & ZAMBON, M.C. Combined PCR- Heteroduplex Mobility Assay for Detection and Differentiation of Influenza A Viruses from Different Animal Species. **J.Clin. Microbiol.**, v. 39, n. 11, p. 4097-4102, 2001.
- FOUCHIER R. A. *et al.* Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **J. Virol.**, 79, p. 2814-2822, 2005.
- HATTA M. & KAWAOKA Y. The continued pandemic threat posed by avian influenza viruses in Hong Kong. **Trends Microbiol.**, v.10, n.7, p. 340-344, 2002.
- HIRST, G. H. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. **Science**. v. 94, n. 2427, p.22-23, 1941.

HITT, E. Avian Flu: What Clinicians Need to Know? **Medscape Medical News**; 29/01/04: 3p. 2004.

HOFFMANN, E., STECH, J., LEVENA IRINA *et al.* Characterization of the influenza A virus gene pool in avian species in southern China: was H6N1 a derivative or precursor of H5N1? **Journal of Virology**, v. 74, n. 14, p. 6309-6315, 2000.

HOMME, P. J. *et* EASTERDAY, B. C. Avian influenza infections I – Characteristics of influenza A/Turkey/Winsconsin/1966 vírus. **Avian Disease**, v.14, p. 66-74, 1970.

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

[Http://www.citysaude.com/Biblioteca/Pombos htm](http://www.citysaude.com/Biblioteca/Pombos.htm),- Pombos - p. 1-2, 2000.

[Http://www.cdfa.ca.gov](http://www.cdfa.ca.gov) – Enfermedad de Newcastle virulenta. p. 1-2. Acessado em 03/09/2006.

[Http://www.hhs.gov/nvpo/pandemics/flu 4 htm](http://www.hhs.gov/nvpo/pandemics/flu_4.htm) – Department of Health & Human Services - Acessado em 30/11/2006.

[Http://www.ib.usp.br/ceo/jardim/problemaspomb.htm](http://www.ib.usp.br/ceo/jardim/problemaspomb.htm) – Problemas com pombos domésticos P. 1-2 - Acessado em 13/01/03.

[Http:// www.oie. Int./Enfermidade de Newcastle](http://www.oie.int/Enfermidade_de_Newcastle) - Acessado em 22/04/2002.

[Http://www.isid.org](http://www.isid.org) - <promed @ promedmail.org> - Acessado em 28/03/2004

INGLIS, S. C. *et al.* Polypeptides specified by the influenza virus genome. I – Evidence for eight distinct gene products specified by fowl plague virus. **Virology**, v. 74, p. 489, 1976.

ISTOÉ. Editora Três Ltda. N° 1898, p.76-81, 2006.

JOHNSON, D.C. & MAXFIELD, B.G. An occurrence of avian influenza virus infection in laying chickens. **Avian Dis.** v. 20, p.422, 1976.

KAMPS, B.S.; HOFFMANN, C. & PREISER, W. **Influenza Report.** 225 p.,2006.
Disponível em: <www. Influenza Report.com>.

KARASIN, A.I.; BROWN, I.H.; CARMAN, S. *et al.* Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. **J. Virology.** v.74, n. 19, p. 9322-9327, 2000.

KLOPFLEISCH, R. *et al.* Neurotropism of highly pathogenic avian influenza virus A/chicken/Indonesia/2003(H51) in experimentally infected pigeons (*Columba livia domestica*). **Vet Pathol.** v.43, n.4, p.463-470, jul. 2006.

LANG, G. *et al.* A new influenza virus infection in turkeys. I. Isolation and Characterization of virus 6213, **Can. Vet. J.** n. 9, p. 22, 1968.

LAZZARI, S. & STOHR, K. Avian influenza and influenza pandemics. **Bull World Health Organ.** n. 82, p. 242, 2004.

LESLIE, J. Newcastle Disease: outbreak losses and control policy costs. **Vet. Rec.** n.146, p. 603-606, 2000.

LOUREIRO, B.O. Estudo de um surto de influenza equina ocorrido em 2001 no Estado do Rio de Janeiro mediante a caracterização do vírus e avaliação do esquema vacinal. 2004. 135f. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Molecular - Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ RJ.

MANUGUERRA, J.C. & HANNOUN, C. Série “Méthodes de Laboratoire.” Grippe et autres viroses respiratoires. Surveillance et Diagnostic de Laboratoire. **Institut Pasteur**, Paris, 1999. 286p.

MAPA. **Plano de contingência para influenza aviária e para doença de Newcastle.** p.61, 2006.

MIKULÁŠOVÁ, A.; VARECKOVÁ, E.; FONDOR, E. Transcription and replication of the influenza A virus genome. **Acta Virol.**, v. 44, p.273-282, 2000.

MORIUCHI, H., OSHIMA, T., KOMATSU, S. *et al.* The herald waves of influenza virus infections detected in Sendai and Yamagata cities in 1985-1990. **Microbiology and Immunology.** n.35, p.375-388, 1991.

MURPHY, B.R. & WEBSTER, R.G. Orthomyxoviruses. **In: Fields, B.N., et al. Virology,** #nd ed., Philadelphia, Lappincott-Raven Publishers, p. 1397-1445, 1996.

NASCIMENTO, J.P., KRAWCZUK, M.M., MARCOPITO, L.F. *et al.* Prevalence of antibody against influenza A viruses in the Kren-Akorore, an Indian tribe of Central Brazil, first contacted in 1973. **Journal of Hygiene.** London, v. 95, p. 159-164, 1985.

NETO, H.M. & NUNES, V.F.P. A problemática dos pombos em áreas urbanas. **Vetores & Pragmas.** Letra Capital editora. Rio de Janeiro.v.1, p. 11-14, 1997.

NOGUERA, C.R. La enfermedad de Newcastle: síntomas y lesiones. En: **CENIAP HOY n. 2, mayo-agosto 2003.** Venezuela. ISSN: 1690-4117. Disponível em: <www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n2/texto/cramirez.htm>, acessado em: 11 de março de 2006.

OIE Bulletin – [International disease statistics]. Office International des Epizooties. **Bulletin Office International des Epizooties;** v. 109, n.6, p. 551-576, november/december 1997.

- OLIVEIRA, M.F.; *et al.* Controle de populações de animais sinantrópicos de interesse no município de Maringá. P. 1-5, 2003. Disponível em: [http://www. Maringa .pr.gov .br /forumambiental/ anais/ palestras /fauna_marilda.htm](http://www.Maringa.pr.gov.br/forumambiental/anais/palestras/fauna_marilda.htm) - Acessado em 08/01/03.
- OMS. – **Influenza Aviária – Situação na Indonésia** – Atualização 15. 2006. disponível em: http://who.int/csr/don/2006_05_29/en/index.html.> Acessado em: 10 jun. 2006.
- PANG, Y. *et al.* PCR Múltiplo para agentes respiratórios. **Avian Disease**, v. 46, n.3, p.691-699, 2002.
- PANIGRAHY, B. Isolation of avian influenza virus in Mexico. **Pakistan-Veterinary-Journal**, v. 17, n.1, p. 6-8, 1997.
- PEIRIS, J.S., YU, W.C., LEUNG, C.W. *et al.* Re-emergence of fatal human influenza A subtype H5N1 disease. **Lancet** v.363, p. 582-583, 2004.
- PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. C. S. **Microbiologia vol. II** . Ed. McGraw-Hill do Brasil, 1981. p. 675-679.
- PICCIRILLO, A., CALABRIA, M., BAIANO, A. *et al.* Indagine sulla presenza di virus influenzali aviari in fagiani allevati intensivamente. (Avian influenza viruses in pheasants reared under intensive condition. A virological investigation.). XXXVII Convegno della Societa Italiana di Patologia Aviaria, Flori, Italy, 1-2 October 1998. **Selezione Veterinária**, v. 8, n.9, p. 663-668, 1999.
- Projeto de Vigilância Ativa da Doença de Newcastle e da Influenza Aviária. Manual de Procedimentos Operacionais, Versão Preliminar, Programa Nacional de Sanidade Avícola, Coordenação de Vigilância e Programas Sanitários, Departamento de Defesa Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, **Ministério da Agricultura e Abastecimento**. Brasília, 2001.

- RAMADAN, P. A., ARAUJO, F. B. & FERREIRA, M. A. 12-month follow-up of an influenza vaccination campaign based on voluntary adherence: report on upper-respiratory symptoms among volunteers and non-volunteers. **São Paulo Medical Journal**, São Paulo, v. 119, p. 142-145, 2001.
- RESENDE, J. S., OLIVEIRA, R. L., JORGE, M. A. *et al.*, Influenza A Antibodies in Broilers in Brazil after American Outbreaks of 1983 –1984. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**; v. 42, p. 453-454. 1990.
- ROSE, E., WACKERNAGEL, D.H., & NAGEL, P. Practical use of GPS-localization of feral pigeons *Columba livia* in the urban environment. **British Ornithologist Union**. v.148, n.2, p.231-239, 2006
- SALCEDO, J. R. C. – **Ocorrência de influenza em aves selvagens e pássaros ornamentais no Rio de Janeiro**. 1980. 61f. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.
- 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.
- SAIF, Y. M. *et al.* **Disease of Poultry**. 11th ed. Iowa State Press, 2003. 1231p.
- SCHAFER, U.W. Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und Klassischen Geflügelpest. **Z Naturforsch** v.106, n.2, p.81-91, 1955.
- Selezione Veterinaria. "Fattori immunodepressivi nell'allevamento avicolo" **Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria**. Forli, Italy, v. 8, n. 9, p. 811-817, 1997.
- SELLECK, P. W.; HOOPER, P. T.; GRIX, D. C.; *et al.* The characterization of an influenza A virus isolated from Victorian ducks. **Foreign-Animal-Disease-Report.**, v.22, n. 3, p. 9, 1994.

STUBBS, E. L. Fowl Plague. In. **Disease of Poultry** (ed. Biester, H. E.; Schuarte, L. H.) 4ª edition. The Iowa State University Press, 1964.

TAUBENBERGER, J.K., Reid, A. H. & Fanning, T. G. À caça do vírus da gripe assassina. A mais letal onda de gripe da história está sendo exumada. **Scientific American** – Brasil, Edição nº 35, 7p. Abril de 2005. Duetto Editorial. Disponível em: <[http://www.uol.com.br/sciam/reportagens/A caça do vírus da gripe assassina/imprimir.html](http://www.uol.com.br/sciam/reportagens/A_caça_do_virus_da_gripe_assassina/imprimir.html).> Acessado em: 10 de junho de 2006.

THRUSFIELD, M. **Veterinary Epidemiology**. Blackwell Publishing. 2 Rev. Ed. Pg. 182-184, 2003.

TORO, H., SAUCEDO, C., BORIE, C. *et al.* Health status of free-living pigeons in the city of Santiago. **Avian Pathology**, v.28, n.6, p. 619-623, 1999.

VRANJAC, A. Influenza aviária e casos humanos. **Rev. Saúde Pública**, v. 40, n. 1, p. 187-190, 2006.

WEBSTER, R.G.; SHARP, G.B. & CLASS, E.C. Interspecies transmission of influenza viruses. **Am. J. Resp. Critical Care Med.** v.152, p.825-830, 1995.

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

WERNER, O. & HARDER, T. C. Avian Influenza. **Influenza Report**. p. 48-86, 2006.

WHITEMAN, C. E. *et* BICKFORD, A. A. **Avian Disease Manual**. 3 rd edition, p. 16-20. 1989.

- WHO, 2005. **Avian influenza: assessing the pandemic threat. Available from.** Disponível em: <<http://www.who.int/csr/disease/influenza/who-cds-29/en>> - Acessado em 16/01/06.
- WHO, 2006. **Documented Avian Influenza infections in humans.** Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases> - Acessado em 04/07/2006.
- WHO Study Group. Reconsideration of influenza A virus nomenclature. A WHO memorandum. **Bull. World. Hlth. Org.**, 57 (2), p. 227, 1979.
- WRIGHT, K.E., WILSON, G.A.R., NOVOSAD, D., DIMOK, C., TAN, D., WEB, J.M. Typing and subtyping of influenza virus in clinical samples by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, p. 1180 – 1184, 1995.
- ZHANG, D.L., JIA, J.Y., CHEN, F.W. *et al.* Serological investigation of 16 infectious diseases in rare birds in the Lanzhou area. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, v. 22, n.6, p. 22, 1996.
- ZHOU, N.N., SHORTRIDGE, K.F., CLASS, E.C.J. *et al.* Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. **J. Virology**, v.73, n.4, p.3366-3374, 1999.
- ZHU, C.G. & LI, Y.M. Diagnosis and management of an outbreak of avian influenza in exotic birds. **Chinese Journal of Veterinary Medicine**, v. 22, n.1, p. 20, 1996.

11. ANEXOS

ANEXO 1-Programação utilizada na RT-PCR para VIA	66
ANEXO 2-Lista das Figuras	67
ANEXO 3-Lista dos Quadros	68
ANEXO 4-Lista de Gráficos	69
ANEXO 5-Lista de Abreviaturas	70
ANEXO 6-Mapa 1-Densidade Populacional na Cidade do Rio de Janeiro.	71
ANEXO 7-Mapa 2-Eixos viários.	72
ANEXO 8-Mapa 3-Pontos de Coleta de Amostras	73

ANEXO 1 - PROGRAMAÇÃO UTILIZADA NA RT-PCR PARA VIA

Transcrição Reversa

- ◆ 25 °C por 10 minutos
- ◆ 42°C por 1 hora
- ◆ 95°C por 5 minutos
- ◆ 4°C manter

Primeira PCR

- ◆ 94 °C por 2 minutos
 - ◆ 94 °C por 1 minuto
 - ◆ 68 °C por 1 minuto e 30 segundos
 - ◆ 4°C manter
- } 30 ciclos

Segunda PCR

- ◆ 94 °C por 2 minutos
 - ◆ 94 °C por 1 minuto
 - ◆ 68 °C por 1 minuto e 30 segundos
 - ◆ 72 °C por 1 minuto
 - ◆ 4°C manter
- } 30 ciclos

ANEXO 2 – LISTA DE FIGURAS.

Figura nº.1 Mulher alimentando pombos.	5
Figura nº.2 Morfologia e composição do Vírus Influenza A.	10
Figura nº.3 Surtos de H5N1 em 2005 e as principais rotas de aves migratórias.	13
Figura nº.4 Registros de infecções em humanos pelo vírus influenza aviário.	19
Figura nº.5 Micrografia eletrônica de transmissão de coloração negativa. VIA.	28
Figura nº.6 Representação esquemática de fragmentos da Proteína M.	47
Figura nº.7 Eletroforese em gel de agarose para diagnóstico de VDN.	48
Figura nº.8 Eletroforese em gel de agarose para diagnóstico de VIA/VDN.	48

ANEXO 3 – LISTA DOS QUADROS

Quadro nº.1 Casos humanos confirmados de influenza A aviária (H5N1).	18
Quadro nº.2 Cenário da influenza no mundo, um resumo da história.	22
Quadro nº.3 Patótipos do VDN.	30
Quadro nº.4 Pontos de coleta de amostras.	39
Quadro nº.5 Inoculação das Amostras – Centro I.	41
Quadro nº.6 Inoculação das Amostras – Zona Oeste II.	41
Quadro nº.7 Inoculação das Amostras – Zona Sul III.	42
Quadro nº.8 Inoculação das Amostras – Zona Norte IV.	42

ANEXO 4 - LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico nº.1 Percentual de casos humanos de influenza A aviária (H5N1) de 2003 a 2006.	18
Gráfico nº.2 Pontos de coleta de amostras x Amostras Coletadas	39

ANEXO 5 - LISTA DE ABREVIATURAS

apud = citado por

DN = doença de Newcastle

DNA = ácido desoxirribonucleico

cDNA = ácido desoxirribonucleico complementar

et al. = e colaboradores

H = hemaglutinina

HA = prova da hemaglutinação

HI = prova de inibição da hemaglutinação

HPAI = influenza aviária de alta patogenicidade

IA = influenza aviária

OIE = office international des epizooties

OMS = organização mundial de saúde

M = proteína matriz

N = neuraminidase

NP = nucleocapsideo

NS = proteína não estrutural

pb = pares de base

PCR = reação em cadeia da polimerase

PMV = paramixovírus

RNA = ácido ribonucleico

RNA_m = ácido ribonucleico mensageiro

RNP = ribonucleoproteína

RT = transcriptase reversa

VDN = vírus da doença de Newcastle

VIA = vírus da influenza aviária

WHO = world health organization

