

Detecção de anticorpos hemaglutinantes contra o vírus da influenza  
A, subtipo H3N8, H2N2 e H1N1 em cães na zona oeste da cidade  
do Rio de Janeiro.

Gabrielle Sales de Oliveira

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

Orientador: Dr. Cláudio de Moraes Andrade

Rio de Janeiro

2010

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Detecção de anticorpos hemaglutinantes contra o vírus da influenza A, subtipo H3N8, H2N2 e H1N1 em cães na zona oeste da cidade do Rio de Janeiro.

Gabrielle Sales de Oliveira

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:

\_\_\_\_\_ (UENF)  
Dr. Carlos Eurico Pires Ferreira Travassos

\_\_\_\_\_ (UFRJ/FAPERJ)  
Dra. Luz Alba Maria Garcete Fornells Arentz

\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Dra. Maria Helena Simões Villas Boas

Orientador:  
\_\_\_\_\_ (INCQS/FIOCRUZ)  
Dr. Cláudio de Moraes Andrade

**FICHA CATALOGRÁFICA**

Oliveira, Gabrielle Sales'

Detection of hemagglutinins antibodies against influenza A virus, H3N8, H2N2 and H1N1 subtypes in dogs from the west zone of Rio de Janeiro/  
Gabrielle Sales de Oliveira. Rio de Janeiro: INCQS/ FIOCRUZ, 2010.

Xii, 128p., 6il., 3tab.

Tese (Doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2010. Orientador: Claudio de Moraes Andrade

1. Influenza A 2. H3N8 3. H2N2 4. H1N1. 5. Influenza canina. I. Título

Dedico este trabalho aos meus pais Vantuir e Inês, meu irmão Dino e meu esposo Diogo pela dedicação, amor e apoio.

Ao meu orientador pelos ensinamentos, carinho e amizade.

“Nenhuma grande vitória é possível sem que tenha sido precedida de pequenas vitórias sobre nós mesmos”.

L. M. Leonov

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado, fazendo da derrota uma vitória, da fraqueza uma força. Com tua ajuda venci.

Ao meu orientador Dr. Cláudio de Moraes Andrade, pela paciência e credibilidade que teve durante todo tempo e pela confiança depositada em meu trabalho. Agradeço a amizade e os inúmeros ensinamentos adquiridos a cada instante que passamos juntos.

Aos meus pais que me deram a vida e ensinaram a vivê-la com dignidade, que iluminaram meus caminhos com afeto e dedicação para que eu trilhasse sem medos.

Ao meu irmão e meu esposo que estiveram sempre ao meu lado, pelos sorrisos diários, carinho e pelo auxílio fornecido no decorrer deste trabalho.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO/RJ), nas pessoas das doutoras Maíra Halfen Teixeira Liberal e Rossiane de Moura Souza que com profissionalismo abriram as portas do Laboratório de Biologia Animal – Virologia para a execução desse trabalho, cedendo todas as condições necessárias para a realização do mesmo, representando, peça fundamental para sua finalização.

Aos amigos Luz Alba Maria Garcete Fornells Arentz e Waldyr Pessanha Junior pelos conhecimentos transmitidos, paciência, incentivos e pelos muitos momentos de alegria, dos quais tenho grande saudade.

Aos amigos, Livia Maria Santos Rouge, Fabrício Gonçalves Marques e Antônio Carlos Reis Sampaio (*in memoriam*), do Laboratório de Biologia Animal – Virologia (PESAGRO/RJ) pelo auxílio fornecido no decorrer deste trabalho.

Ao professor José Nelson dos Santos Silva Couceiro e sua equipe que prontamente me acolheu e disponibilizou o laboratório de Virologia da UFRJ sempre que foi necessário.

À Médica Veterinária e amiga Sylvia Cristina Silva de Azevedo pelo gentil auxílio nas coletas das amostras.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária

Aos colegas, alunos de mestrado e doutorado do INCQS, pela convivência, ajuda e amizade.

À Fundação Oswaldo Cruz que me concedeu a oportunidade de realizar o curso de Pós-graduação.

## RESUMO

Existem inúmeras doenças que podem ser consideradas de risco para a medicina veterinária e para saúde pública entre elas se destaca a Influenza A. O agente etiológico desta enfermidade é um vírus pertencente a família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus A*. Vários animais, inclusive os cães, estão inseridos na cadeia epidemiologia desta enfermidade. O sucesso epidemiológico do vírus influenza deve-se ao surgimento de novas variantes antigênicas, devido à elevada frequência de rearranjo genético e as consequentes modificações antigênicas nas glicoproteínas de superfície viral. Os freqüentes rearranjos genéticos, a ocorrência recente de surto de influenza canina e os resultados de estudos envolvendo o vírus influenza em cães vêm despertando a atenção das autoridades sanitárias de diversos países, devido à capacidade adaptativa desse vírus e o estreito contato do homem com os cães. Em virtude da inexistência de dados que evidencie a circulação do vírus influenza em cães no Brasil, o presente trabalho teve como objetivo a detecção de anticorpos contra aos subtipos H3N8, H2N2 e H1N1 do vírus influenza A em cães oriundos da zona oeste da cidade do Rio de Janeiro. Do total de 304 soros analisados pela prova de HI, 70,4% apresentaram reatividade com títulos entre 10 e  $\leq 80$  para o subtipo H3, 30,6% para o subtipo H2 e 48,% positivos para o subtipo H1. Os resultados obtidos tornam evidente a circulação desses subtipos entre os caninos, ressaltando a necessidade de uma maior vigilância sanitária, do estabelecimento de rotina diagnóstica e epidemiológica da influenza canina, alertando as autoridades sanitárias responsáveis sobre o risco de possíveis surtos de influenza entre os caninos e os possíveis problemas que possam advir para os criadores, proprietários e para saúde pública.

## ABSTRAT

There are many diseases considered risky to the veterinary medicine and to the public health, and among them the Influenza A stands out. The etiologic agent of this infirmity is a virus from the genus *Influenzavirus A* of the *Orthomyxoviridae* family of viruses. Many animals, dogs included, are part of the epidemiologic chain of this infirmity. The epidemiologic success of the influenza virus is due to the uprising of new strains, which result from the high frequency of genetic rearrangements and the consequent antigenic modifications on the glycoproteins from the viral surface. The frequent genetic rearrangement, the recent occurrence of a canine influenza outbreak and the results of studies about influenza virus in dogs, has been calling the attention of sanitary authorities from many countries, due to the adaptation capacity of this virus and the close contact that exists between men and dogs. As there is no data evidence of the circulation of this virus among dogs in Brazil, this paper aims to detect the antibodies against H3N8, H2N2 and H1N1 influenza A subtypes in dogs from the west zone of Rio de Janeiro city. From the 308 serum samples analyzed through HI assay, 70,4% showed reaction with titers between 10 and  $\leq 80$  to the H3 subtype, 30,6% to the H2 subtype and 48% were positive to the H1 subtype. This results make evident the circulation of these subtypes among canines, standing out the need of a more intense sanitary vigilance, and the establishment of a canine influenza diagnostic and epidemiologic routine, alerting the responsible sanitary authorities about the possible risk of an influenza outbreak among canines and the consequent problems that it could cause to breeders, owners and to the public health.

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1.</b> Organização do genoma do vírus da influenza .....	11
<b>Quadro 2.</b> Distribuição conjunta dos subtipos H3N8, H2N2 e H1N1.....	86
<b>Tabela 1.</b> Distribuição do vírus influenza em diferentes estados no ano de 2007 expresso em porcentagem .....	40
<b>Tabela 2.</b> Taxa de mortalidade e distribuição do total de óbitos confirmados laboratorialmente por região administrativa da OMS em 2009.....	42
<b>Tabela 3.</b> Títulos de anticorpos para os subtipos H3N8, H2N2 e H1N1.....	85

**LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Possível origem das pandemias de influenza.....	5
<b>Figura 2.</b> Ciclo Replicativo do vírus influenza.....	19
<b>Figura 3.</b> Cadeia epidemiológica do vírus influenza.....	25
<b>Figura 4.</b> Mecanismos de surgimento de novas variantes do vírus influenza com caráter pandêmico.....	33
<b>Figura 5.</b> Títulos de anticorpos para os subtipos H3N8, H2N2 e H1N1.....	85
<b>Figura 6.</b> Distribuição conjunta dos subtipos H3N8, H2N2 e H1N1.....	87

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANFAL PET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CD4 – Cluster of differentiation 4

CD8 – Cluster of differentiation 8

CDC – Center for Disease Control

COMAC – Comissão Animais de Companhia

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EIE – Ensaio Imuno Enzimático

FAO - Food and Agriculture Organization

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

H – Hemaglutinina

HA – Hemaglutinação

HI – Inibição da Hemaglutinação

HPAI – Highly Pathogenic Avian Influenza

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IgA – Imunoglobulina Classe A

IgG – Imunoglobulina Classe G

IgM – Imunoglobulina Classe M

INF – Interferon

LPAI – Low Pathogenic Avian Influenza

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDCK – Madin-Darby Canine Kidney

MS – Ministério da Saúde

M1 – Proteína de matriz

M2 – Proteína de canal

μL – Microlitro

N – Neuroaminidase

NP – Nucleoproteína

NS – Proteína não estrutural

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Phosphate Buffered Saline  
PCR – Polymerase Chain Reaction  
RER – Retículo Endoplasmático Rugoso  
RNA – Ácido Ribonucléico  
RNAc – RNA complementar  
RNAm – RNA mensageiro  
RNAss – RNA de fita simples  
RNAv – RNAviral  
RNP – Ribonucleoproteína  
RT – Transcriptase Reversa  
SIVEP – Sistema de Vigilância Epidemiológica  
SPF – Specific Pathogen Free  
SRH – Hemólise Radial Simples  
SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde  
TAA – Terapia Assistida com Animais  
TGF- $\alpha$  – Fator de Crescimento Tumoral  
UHA – Unidade Hemaglutinante  
VN – Vírus neutralização  
WHO – World Health Organization

**SUMÁRIO**

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	01
1.1 Histórico	01
<b>2. O VÍRUS DA INFLUENZA</b>	06
2.1. Classificação geral	06
2.2. Nomenclatura	07
2.3. Estrutura e composição química	08
2.4. Resistência aos agentes físicos e químicos	11
2.5. Hemaglutinina (H)	12
2.6. Neuroaminidase (N)	14
2.7. Ciclo viral	15
2.7.1. Adesão	15
2.7.2. Transcrição e replicação do RNA	16
2.7.3. Tradução	17
2.7.4. Brotamento	18
2.8. Variações antigênicas e genômicas	19
2.9. Imunologia	21
2.9.1. Resposta celular	21
2.9.2. Resposta humoral	22
2.10. Transmissão interespécie	24
2.10.1. Aves	25
2.10.2. Suínos	29
2.10.3. Eqüinos	33
a) A influenza eqüina e o homem	36
2.10.4. Homem	38
a) Influenza Pandêmica (H1N1) 2009	42
<b>3. INFLUENZA CANINA</b>	45
3.1. Distribuição geográfica	53
3.2. Transmissão	53
3.3. Período de incubação	54
3.4. Sintomatologia	54
3.5. Achados Anatomo-patológicos	56
3.6. Morbidade e mortalidade	57

3.7. Diagnóstico	58
3.7.1. Identificação do agente	58
a) Isolamento viral em ovos embrionados	60
b) Isolamento viral em cultivo celular	60
c) Reação de hemaglutinação (HA)	61
d) Enzimoimunoensaio – ELISA	62
e) Técnicas moleculares	63
3.7.2. Provas sorológicas	64
a) Reação de inibição da hemaglutinação (HI)	64
b) Enzimoimunoensaio – ELISA	65
3.8. Tratamento	65
3.9. Prevenção e controle	66
3.9.1. Vigilância da Influenza	70
3.10. Relação homem – cão	73
3.11. População de idosos no Brasil	75
<b>4.OBJETIVOS</b>	<b>77</b>
<b>4.1.GERAIS</b>	<b>77</b>
<b>4.2.ESPECÍFICOS</b>	<b>77</b>
<b>5.MATERIAIS E MÉTODOS.</b>	<b>78</b>
5.1. Materiais	78
5.1.1. Amostras	78
5.1.2. Antígenos	78
5.1.3. Ovos embrionados	78
5.1.4. Hemácias	79
5.1.5. Solução de tampão fosfato (PBS)	79
5.1.6. Caolim	79
5.1.7. Alsever	80
5.2 Métodos	80
5.2.1. Produção dos antígenos	80
5.2.2. Inativação dos antígenos	80
5.2.3. Suspensão de hemácias	81
5.2.4. Prova da hemaglutinação (HA)	81
5.2.5. Avaliação sorológica	81
a) Tratamento dos soros	81

b) Prova de inibição da hemaglutinação (HI)	82
<b>6.RESULTADOS</b>	<b>84</b>
<b>7.DISSCUSSÃO</b>	<b>88</b>
<b>8.CONCLUSÕES</b>	<b>102</b>
<b>9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. HISTÓRICO

Um bacilo descrito por Pfeiffer foi o primeiro microorganismo responsabilizado como causador da influenza, recebendo o nome de *Haemophilus influenzae* tido como o causador das grandes pandemias de 1889-1890. Mais tarde, em 1933, Smith e colaboradores comprovaram que lavados nasais filtrados de pacientes humanos com a doença, portanto livres do *Haemophilus*, quando inoculados intranasal em furões, produziam uma doença febril muito semelhante àquela ocorrida em 1889 e 1890 (SMITH, ANDREWES & LAIDLAW, 1933) a partir dessa descoberta levantou-se a hipótese de que a doença poderia ser causada por um vírus, ficando claro que o *Haemophilus influenzae* que era tido inicialmente como o causador dessas pandemias, era na realidade somente um dos vários germes de associação nesses surtos epidêmicos, assim como, *Staphylococcus aureus* e mesmo *Pneumococos*.

Em 412 a.C. foi registrado na Grécia o primeiro relato científico da influenza. Hipócrates, pai da medicina, descreveu uma doença respiratória que em algumas semanas matou muitas pessoas e depois desapareceu (NETO, 2001).

Uma das características do vírus influenza é a sua circulação na forma de epidemias e pandemias, que é acompanhada por um aumento significativo nos índices de mortalidade e morbidade. As epidemias de influenza estão associadas às pequenas alterações no genoma desses vírus e ocorrem quase que anualmente. As pandemias apresentam quadro mais dramático, pois estão relacionadas ao aparecimento de novos subtipos do vírus influenzas. As pandemias são acompanhadas de um aumento significativo das taxas de morbidade e mortalidade em todas as faixas etárias, altas perdas econômicas e ocorrem de maneira imprevisível em intervalos irregulares de tempos (COX & FUKUDA, 1998).

A gravidade das epidemias e pandemias de Influenza ocorridas no passado fez com que o vírus influenza fosse o mais estudado antes do surgimento do vírus da Imunodeficiência humana. Apesar disto, o conhecimento a respeito de muitos aspectos da doença permanece fragmentado. Estudiosos acreditam que novas pandemias poderão ocorrer,

mas estão incertos sobre quando e da habilidade dos serviços de saúde em implementar medidas que evitem as tragédias do passado (GLEZEN, 1996).

Entre maio e junho de 1889, iniciou-se uma grande pandemia de gripe com origem na Sibéria, que se alastrou para o ocidente, atingindo a Europa Ocidental em novembro. Em 1890, difunde-se pela África, Oriente Médio, Índia, Austrália, Nova Zelândia e América. Esta pandemia afetou grande parte da população e ao redor de 300 mil pessoas morreram, principalmente idosos em decorrência de complicações, como pneumonia bacteriana secundária. Sugeriu-se que esta pandemia foi originada por um novo mutante do vírus influenza, relacionado com o atual subtipo H2N2 (NETO, 2001).

Entretanto, foi a pandemia de 1918, conhecida como Gripe Espanhola, a mais assustadora, o surto recebeu este nome porque a Espanha foi um dos últimos países a ser atingido. A gripe acometeu cerca de 50% da população mundial e vitimou mais de 40 milhões de pessoas, matando mais que a primeira guerra mundial, passando a ser conhecida como “o maior holocausto médico já visto”. A doença chegou ao Brasil através de tripulantes infectados que desembarcaram no porto de Recife em setembro de 1918 e dois meses depois já havia se alastrado por todo país (NETO, 2001).

O efeito da epidemia já desfigurava o Rio de Janeiro. Em 15 de outubro um jornal de circulação publicou: “Tem-se a impressão que o Rio de Janeiro é um vasto hospital”. Em caráter excepcional, o governo unificou os serviços de higiene municipal e federal e tentou contornar a escassez de médicos. Para atender a catástrofe foi necessário recrutar e remanejar o pessoal administrativo, além de farmacêuticos, bacteriologistas, microscopistas e até mesmo voluntários. Neste contexto exacerbou-se na imprensa a discussão sobre os meios de prevenir e curar a gripe; leigos ou cientistas enviavam as suas fórmulas: desinfecção do ar com incenso, alcatrão e alfazema; pitada de tabaco ou banhos com vapor d’água misturadas com sal de cozinha; lavagem intestinal com cozimento de camomila, dentre outras, sobretudo receitas com limão que levou a seu súbito aumento de preço e a sua escassez. A tragédia foi resumida em uma manchete em jornal da época “Toda a cidade espirra, tosse e palpita de febre”. A cidade foi progressivamente paralisando até ganhar um aspecto sepulcral. Todos os serviços funcionavam precariamente por falta de pessoal, até a limpeza pública deixou de recolher o lixo. No dia 19 de outubro foi declarado feriado por três dias. A gripe já atingia

metade da população carioca, aproximadamente quinhentas mil pessoas. A face mais aterrorizante da crise foi à exposição pública de cadáveres. O serviço de remoção do cemitério São Francisco Xavier estava sendo feita em caminhões que amontoavam os cadáveres, em caixões ou completamente expostos às vistas públicas, alguns quase despidos. Inúmeros veículos circulavam com cadáveres em tal estado de decomposição que deixavam um “odor fétido horrível pela cidade“. No cemitério de Realengo efetuavam-se em média 35 enterros por dia, no final de outubro de 1918, os órgãos oficiais registraram a média de 450 enterros por dia (BRITO, 1997).

No Brasil, cerca de 350 mil pessoas (65% da população) foram infectadas e entre as vítimas estava o ilustre personagem político que morreu logo após sua reeleição: o presidente da República Rodrigues Alves. O Rio de Janeiro contabilizou mais de 12.000 mortes e São Paulo, mais de 12.300. Estima-se que 35.240 mortes vitimaram os brasileiros durante a epidemia de Gripe Espanhola (MARKS & BEATTY, 1976; CROSBY, 1989).

Taubenberger e colaboradores (1997) através de estudos filogenéticos das sequências nucleotídicas da hemaglutinina (H), neuroaminidase (N), nucleoproteína, proteína M1 e M2 demonstraram que o vírus pandêmico apresentava relações genômicas com o vírus da influenza suína H1N1 oriundo de um ancestral aviário (Figura 1).

A pandemia de 1918 estimulou enormemente o avanço das pesquisas em Virologia. Em 1933, Smith e colaboradores identificaram o vírus Influenza A, ao infectar furões. Pouco tempo depois foi possível obter informações sobre a natureza e prevalência desses vírus pela sua adaptação em ovos embrionados bem como o desenvolvimento das primeiras vacinas com vírus inativado. Na década de 40, descobriu-se dois novos tipos de vírus influenza, denominados respectivamente de tipo B (1940) e tipo C (1949) e também a sua capacidade de aglutinar eritrócitos (HIRST, 1941). Esse acúmulo de conhecimento foi essencial para que Schaffer pudesse associar o vírus da influenza com a praga aviária (*fowl plague*), confirmando a possibilidade da replicação desses vírus em aves, demonstrando a necessidade de monitoramento da doença na natureza (COX & SUBBARAO, 1999).

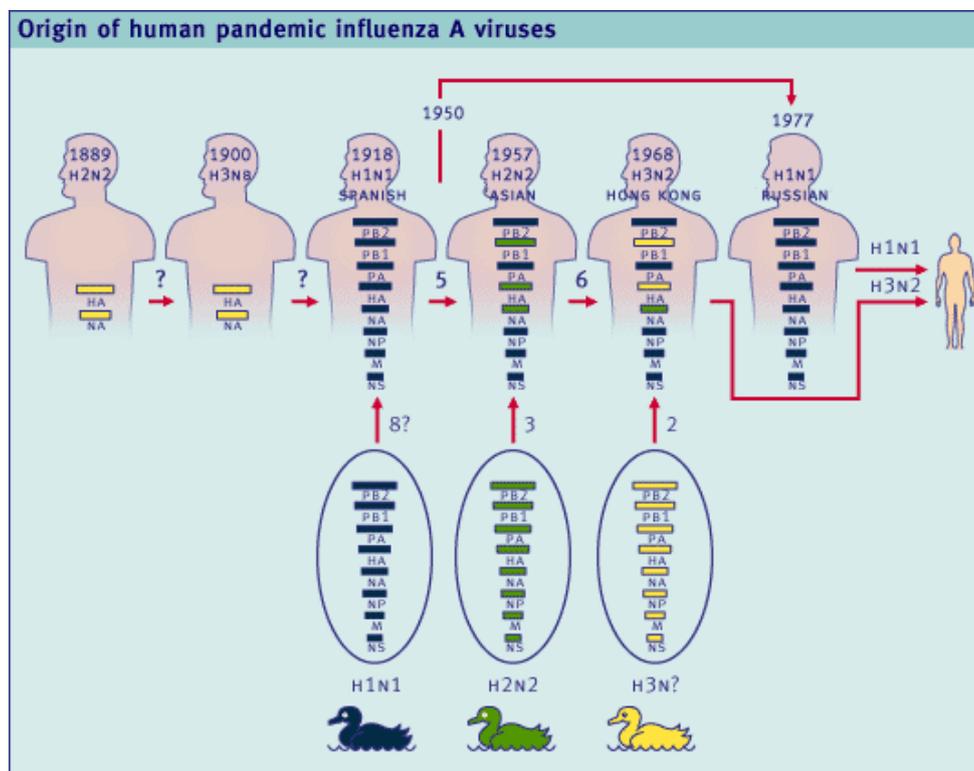
Trinta e nove anos após a última pandemia, surgiu em fevereiro de 1957, na província de Yunan, na China, mais uma pandemia de influenza,

conhecida como “Gripe Asiática”, causada pelo surgimento de um novo subtipo do vírus influenza (H2N2) oriundo do rearranjo genético do vírus humano de 1918 com 3 genes (PB1, H e N) de um vírus aviário (Figura 1). A maioria das mortes ocorreu devido à pneumonia bacteriana secundária, o subtipo H2N2 pandêmico se alastrou pelo mundo em 6 (seis) meses, matando aproximadamente um milhão de pessoas (PYLE & PATERSON, 1986).

Em 1968, surgiu em Hong Kong, uma epidemia de influenza conhecida como “Gripe de Hong Kong”. Os primeiros casos foram notificados em julho de 1968 e neste mesmo ano o vírus já havia se disseminado mundialmente e matou mais de 46 mil pessoas, neste episódio o subtipo H3N2 tinha sido transmitido das aves para o homem (Figura 1) (POTTER, 1998). Essa pandemia foi relacionada com baixos índices de mortalidade quando comparada com as duas pandemias anteriores (STUART-HARRIS, SCHILD & OXFORD, 1985). Existem várias hipóteses para essa baixa mortalidade. Primeiro, mudou somente a H (H3) do vírus que havia circulado previamente, o vírus Asiático (H2N2), sendo assim os anticorpos produzidos para a cepa asiática poderiam oferecer alguma imunidade à população e segundo Masurel (1969), existem evidências que um vírus com similar hemaglutinina circulou em 1889-1900, porque pessoas com sessenta anos de idade ou mais, tinham anticorpos neutralizantes para esse novo subtipo. O surgimento deste novo subtipo marcou a “era do H3N2”, pois desde a sua pandemia de 1969, esse subtipo permanece circulando na população humana e é um dos responsáveis pelas epidemias atuais de influenza em todo o globo.

Em 1977, ocorreu na Rússia uma pandemia causada pelo subtipo H1N1, análises genômicas comprovaram que este vírus era bastante semelhante ao que havia circulado na década de 50 (Figura 1). Como é pouco provável que este vírus tenha se mantido inalterado, visto que os vírus influenza sofrem contínuas mutações, acredita-se que por algum acidente este vírus estava congelado e foi reintroduzido na população (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001). A pandemia de 1977 não é considerada como verdadeira por muitos (HAMPSON & COX, 1996), por ter tido um perfil diferenciado das outras pandemias, acometendo, com maior gravidade, pessoas com menos de 20 anos de idade e poupando a população mais idosa de casos mais grave pela presença de anticorpos neutralizantes (STUART-HARRIS, SCHILD & OXFORD, 1985).

A figura abaixo exemplifica didaticamente a origem dos subtipos virais causadores das pandemias de influenza descritas no período de 1889 a 1977.



**Figura 1.** Possível origem das pandemias de influenza (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001).

No ano de 1997 uma ameaça de pandemia alertou o mundo: a Gripe das Aves, causada por uma variante do vírus influenza H5N1 anteriormente detectado apenas em aves, uma mutação tornou-o transmissível também para humanos. Foi o primeiro relato de transmissão direta do vírus aviário para o homem, causando doença em 18 pessoas e 6 foram a óbitos, um alarmante índice de 30% de óbitos. Por isso cerca de 1,5 milhões de frangos foram sacrificados antes que a doença atingisse maiores proporções (ZHOU et al., 1999).

Após seis anos de trégua, a epidemia ressurgiu no sudeste asiático com novos casos humanos, estendendo-se a partir de 2005 para Ásia Central, Europa, África e Oriente Médio. No período de 2003 a março de 2010 foram registrados pela OMS 489 casos humanos confirmados

laboratorialmente e 289 óbitos em 12 países. (WHO, 2010). Desde 1997, surtos envolvendo o subtipo H5N1 foram identificados em aves domésticas e selvagens em mais de 50 países, o mais recente foi descrito na Romênia em 16/03/10 (OIE, 2010).

Recentemente, em abril de 2009, surgiu no México a mais recente pandemia de influenza, esta foi a primeira vez desde 1968 que há uma declaração da OMS de um alerta de pandemia de gripe, o grande número de casos diagnosticados no mundo levou a OMS a elevar o nível de alerta do vírus H1N1 para fase 6 em menos de dois meses da data do primeiro caso. Milhares de casos foram confirmados em mais de 100 países e as proporções só não foram maiores devido à baixa taxa de letalidade (WHO, 2009b; FAO, 2009).

Estudos antigênicos e genômicos identificaram a amostra de 2009 (A/Califórnia/04/2009) como uma nova variante do vírus influenza (H1N1) oriunda do rearranjo genético de quatro diferentes estirpes de vírus influenza, uma humana, outra aviária e duas de origem suína que não havia sido detectada previamente entre humanos ou suínos (WHO, 2009b; FAO, 2009).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), do início da pandemia ao final do ano epidemiológico de 2009, em 2 de janeiro de 2010, houve notificação de circulação do vírus pandêmico em 208 países, territórios ou comunidades. Sendo que no final do ano de 2009, as áreas com maior atividade na transmissão eram o centro, o oeste e o sudeste da Europa, norte da África e sul da Ásia. Em 2009, foram notificados 12.799 óbitos confirmados laboratorialmente no mundo. (SVS, 2010a).

No Brasil, Até a semana epidemiológica nº 52 (02/01/2010), foram confirmados 44.544 casos de influenza pandêmica (H1N1) e 2.051 óbitos, apresentando uma taxa de mortalidade de 1,1/100 mil habitantes e 4,6 % (2.051/44.544) de letalidade (SVS, 2010a).

## **2. O VÍRUS INFLUENZA**

### **2.1. Classificação geral**

O vírus influenza pertence à família *Orthomyxoviridae*, gênero *Influenzavirus* e está dividido em tipos A, B e C distinguíveis pela composição da unidade estrutural protéica do nucleocapsídeo (NP) e da proteína não

glicosilada do envelope ( $M_1$ ), denominadas de antígenos internos (ACHA & SZYFRES, 2003).

O vírus da influenza A foi isolado em 1933 por Smith, infecta o homem, suínos, eqüinos, mamíferos marinhos, cães, gatos e uma grande variedade de aves, é altamente transmissível e mutável, causando altas taxas de morbidade e mortalidade e, por isto, merece destaque em saúde pública. O vírus tipo B foi identificado pela primeira vez em 1939, infecta exclusivamente humanos, sendo menos patogênico e mutagênico que o tipo A, acometendo principalmente crianças e com complicações menos graves. O tipo C, foi descrito em 1950, além dos humanos infecta também os suínos, é estável do ponto de vista antigênico e produz doença leve (ACHA & SZYFRES, 2003).

A classificação dos subtipos é baseada nas glicoproteínas de superfície: a hemaglutinina (H) e a neuroaminidase (N). O sucesso epidemiológico do vírus influenza deve-se ao surgimento de novas variantes antigênicas desse vírus, devido à elevada frequência de rearranjos genéticos e as conseqüentes modificações antigênicas destas glicoproteínas de superfície viral. Esta variabilidade é o fator responsável pela contínua evolução de novas cepas e epidemias de influenza, uma vez que a maioria da população não apresenta imunidade para as novas estirpes (COX & FUKUDA, 1998).

## 2.2. Nomenclatura

A nomenclatura do vírus influenza foi instituída em 1971 pela Organização Mundial da Saúde, sendo utilizada mundialmente na caracterização destes vírus. De acordo com os antígenos internos, nucleoproteína (NP) e proteína de matriz (M1), classifica-se o vírus *Influenza* nos seus gêneros. Os antígenos superficiais hemaglutinina (H ou HA) e neuroaminidase (N ou NA) permitem classificar os subtipos do gênero *Influenzavirus A* (WHO Study Group, 1971).

Sendo assim, a denominação atribuída a cada amostra viral deve incluir: o tipo/ espécie do hospedeiro (no caso do homem, omite-se) / origem geográfica/ número de série/ ano de isolamento/ antígenos de superfície (subtipo de Hemaglutinina - H / subtipo de Neuroaminidase - N). Entretanto, as informações sobre virulência não estão incluídas na nomenclatura (ACHA & SZYFRES, 2003)

### 2.3. Estrutura e composição química

São vírus RNA de fita simples, envelopados, com tamanho de 80-120 nm de diâmetro, pleomórficos, capsídeo com simetria helicoidal e 100nm de diâmetro, aproximadamente (LAMB & KRUG, 1996; MURPHY & WEBSTER, 1996).

A composição química do vírus influenza varia de acordo com o subtipo e com a célula hospedeira. A variação mais observada é no que se diz respeito à proporção e composição de lipídios e carboidratos. A composição aproximada é: 0,8 a 1,1% de ácido ribonucléico fita simples, 70 a 75% de proteínas, 20 a 24% de lipídeos e 5 a 8% de carboidratos (LAMB & KRUG, 1996; MURPHY & WEBSTER, 1996).

A estrutura dos vírus influenza A e B são similares, as principais diferenças entre eles é a proteína que forma o canal de membrana e o tamanho do genoma. No tipo A o canal é formado por proteínas denominadas de M2 (ZEBEDEE & LAMB, 1988) codificadas por um *splicing* do RNAm do segmento genético 7 (Quadro 1), que codifica também a proteína M1(LAMB & CHOPPIN, 1981). No tipo B o canal de membrana é formado por outra proteína denominada NB (BETAKOVA, NERMUT & HAY, 1996; BRASSARD, LESER & LAMB, 1996) codificada pelo segmento genético 6 em um “overlapping reading frames” do mesmo RNAm que codifica a glicoproteína N (SHAW, CHOPPIN & LAMB, 1983). Quanto ao tamanho do genoma o tipo A possui 13588 nucleotídeos (analisados da variante A/PR/8/34) enquanto o tipo B possui 14634 nucleotídeos, esse subtipo possui longas regiões não codificadas

O core viral é constituído por 8 segmentos de ácido ribonucléico de fita simples (RNAss) com polaridade negativa (Quadro 1). Cada segmento encontra-se fortemente associado a uma nucleoproteína-NP (KLUMPP, RUIGROK & BAUDIN, 1997), formando uma estrutura na qual o RNA enovela-se, adquirindo um modelo helicoidal (MIKULÁŠOVÁ, VARECKOVÁ & FONDOR, 2000) e a uma RNA-polimerase constituída por três polipeptídios: PB1, PB2 e PA (LAMB & KRUG, 1996; BROWN, 2000). Esse conjunto é denominado ribonucleoproteína (RNP) (McGEOCH, FELLNER & NEWTON, 1976; DESSELBERGER et al., 1980). As RNPs estão localizadas dentro de

uma estrutura formada de proteínas M1, que confere rigidez a membrana (ZEBEDEE & LAMB, 1988).

A natureza fragmentada do material genético do vírus influenza induz altas taxas de mutação durante a fase de replicação, em especial da hemaglutinina e neuraminidase, as duas glicoproteínas da superfície viral. Estas mutações ocorrem de forma independente e habitualmente provocam o aparecimento de novas variantes para as quais a população ainda não apresenta imunidade (FORLEO-NETO et al., 2003)

O segmento 7 do genoma do vírus influenza A codifica as proteínas M1 e M2 (Quadro 1). A proteína matriz do envelope viral M1, fica localizada na face interna da dupla camada lipídica (KATES et al., 1962; BROWN, 2000) Presentes nessa membrana estão três proteínas: duas glicoproteínas, a hemaglutinina (H) a neuroaminidase (N) e a proteína de canal de membrana M2 (ZEBEDEE & LAMB, 1988; MOULD et al., 2000).

A proteína matriz do envelope viral M1 representa um antígeno tipo ou gênero-específico (influenza vírus A, B ou C) altamente conservado dentro de cada tipo. Ao revestir a face interna do envelope, confere a este rigidez. Ao interagir com a RNP, a M1 inibe a transcrição e direcionamento ao núcleo celular, enquanto após sua síntese é enviada ao núcleo para permitir a saída da RNP do núcleo (LAMB & KRUG, 1996).

As hemaglutininas são responsáveis pela adsorção dos vírus aos receptores presentes em diferentes tipos de células susceptíveis e aos eritrócitos de várias espécies animais (HIRST, 1941), pela penetração do vírus através da membrana citoplasmática, intermediando a fusão do envelope da partícula endocitada com a membrana endossomal, resultando na liberação dos nucleocapsídeos no citoplasma, além de constituir o principal antígeno, para o qual são dirigidos anticorpos neutralizantes protetores (COUCH & KASEL, 1995).

Por outro lado, a glicoproteína N tem como importante função à liberação dos vírus do interior da célula, após a replicação viral e da superfície de hemácias, depois da adsorção, possibilitando a difusão das partículas virais nos tecidos do hospedeiro (WEBSTER, 1970).

A hemaglutinina, juntamente com a neuraminidase determina o impressionante aspecto do envelope viral, caracterizado por aproximadamente 500 projeções radiais de H que se projetam para o exterior. A proporção H/N é

de 4 a 5 H para cada N (ACHA & SZYFRES, 2003). Atualmente são conhecidas 16H e 9 N antigenicamente distintas e quaisquer combinações entre essas duas glicoproteínas são possíveis na natureza (EASTERDAY et al., 1997; FOUCHIER et al., 2005)

A proteína M2 está presente em pequeno número no vírion (20 a 60 unidades), embora seja muito expressada na membrana plasmática da célula infectada. A M2 atravessa toda espessura do envelope viral funcionando como canal iônico permitindo a entrada de íons H<sup>+</sup> e conseqüentemente, a acidificação no interior do vírus (pH= 5 ou 6) enquanto ele está passando pelo endossoma, que é ácido. Isso é necessário para que ocorra liberação das partículas de ribonucleoproteínas para o citoplasma depois da fusão da membrana do vírus com o endossoma (BUKRINSKAYA et al., 1982; HAY, SKEHEL & McCAULEY, 1982; WHARTON et al., 1990; MARTIN & HELENIUS, 1991).

Duas proteínas a NS1 e NS2 ou NEP, são codificadas pelo segmento 8 do genoma viral (Quadro 1). A proteína não estrutural (NS1) é inibidora do processamento pós-transcricional de RNAm celular impedindo assim a síntese de proteínas antivirais, não sendo encontrada na partícula viral, somente na célula infectada (CHEN & KRUG, 2000). A NS2 ou NEP está envolvida na síntese viral, executando a função de mediar à exportação nuclear dos RNAs do vírion (O'NEILL, TALON & PALESE, 1998)

**Quadro 1.** Organização do genoma do vírus da influenza

Genoma	Tamanho	Polipeptídeos codificados	Moléculas
Segmento <sup>*a</sup>	Rna viral	Tipo A	Por vírion
1	2341	PB2	30 – 60
2	2341	PB1	30 – 60
3	2233	PA	30 – 60
4	1778	H	500
5	1565	NP	1000
6	1413	N	100
7	1027	M1 e M2	3000, 30 – 60 <sup>*c</sup>
8	890	NS1 e NS2 <sup>*b</sup>	nd, 130 – 200

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

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

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

nd – Não determinado

#### 2.4. Resistência a agentes físicos e químicos

Em virtude do alto teor de lipídeos o vírus influenza é sensível aos detergentes e a quase todos os desinfetantes. As partículas virais são rapidamente destruídas quando entram em contato com formaldeído, agentes oxidantes, ácidos, éter, hidroxilamina, íons amônio e detergentes como o duodecil sulfato de sódio e desoxicolato de sódio (COUCH & KASEL, 1995).

Os diferentes subtipos requerem tempos diferentes de exposição aos raios ultravioleta para sua inativação, sendo os mesmos destruídos em pH ácido e relativamente estáveis entre o pH 7,0 e o pH 8,0 (MOSES, BRANDLY & JONES, 1947; LANG et al., 1968).

O vírus é muito estável a temperaturas abaixo de -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 e são inativados rapidamente a 56 °C durante 30 minutos (OIE, 2008a).

## 2.5. Hemaglutinina (H)

A H é codificada pelo segmento 4 do RNA genômico, sendo sintetizada no retículo endoplasmático rugoso (RER) como um polipeptídeo único H0. O segmento 4 do RNA é constituído por 1742 a 1778 nucleotídeos e codifica um polipeptídeo de 562 a 566 resíduos de aminoácidos, possuindo a cadeia H1 de 319 a 326 e a cadeia H2 cerca de 221 a 222 resíduos de aminoácidos (LAMB & KRUG, 1996; SKEHEL & WILEY, 2002) (Quadro 1).

Um peptídeo de sinalização direciona a cadeia nascente para a membrana do RER, onde é clivada por peptidase de sinal que a transforma em proteína protótipo tipo 1 H, integrante da membrana viral. A clivagem pode resultar em perda de um a seis resíduos. A H é pós-maturada pela adição de sete cadeias de oligossacarídeos, à cadeia principal e três resíduos de palmitato adicionados por ligação tio-éter aos três carbonos terminais das cisteínas proximais. A anexação de cinco cadeias de carboidratos na estrutura lateral da H1 e uma na cadeia lateral de H2 resultam aparentemente na conformação tridimensional adequada da H. Apenas uma cadeia de açúcar é anexada à região globular de H1, para estabilização das associações dos oligômeros entre as unidades globulares do topo da estrutura (LAMB & KRUG, 1996; WILEY & SKEHEL, 1990).

A clivagem da H em duas cadeias ligadas por pontes dissulfídicas, H1 e H2, é determinante na patogenicidade e disseminação da infecção viral, no entanto depende diretamente da estirpe viral, tipo de célula hospedeira e condições de replicação, necessária para a infecciosidade. Três moléculas de H2 formam um trímero espiralado que está ancorado e se projeta do envelope, na extremidade distal do qual se conecta a H1, para a subunidade globular mais externa. Uma região hidrofóbica de H2, que é embebida na haste da H e torna-se exposta em pH ácido, forma o peptídeo da fusão (WILEY & SKEHEL, 1990; LAMB & KRUG, 1996).

A homologia dos aminoácidos da H entre duas estirpes uma do grupo A e outra do grupo B foi de 24% em H1 e 39% em H2, sugerindo relacionamento evolutivo entre os grupos A e B do vírus Influenza (LAMB & KRUG, 1996).

A H é responsável pela adsorção ao receptor celular. Este receptor é composto de glicoproteína siálica, contendo o ácido N-acetil neuroamínico terminal (COOH-C=O-CH<sub>2</sub>-CH-OH-CH-NH-C=O-CH<sub>3</sub>-CH-OH-

CH-OH-CH<sub>2</sub>-OH), proteína que necessita maturação pós tradução para poder intermediar a fusão com a membrana da célula sendo infectada (KINGSBURY, 1990).

Todos os tipos de hemaglutininas (H1 a H16) reconhecem cadeias de açúcares da série sialil-lactose tipos I e II (ácido siálico) em glicoproteínas e glicolipídios nas células alvo como moléculas receptoras. Diferentes ácidos siálicos nas membranas das células resultam em diferentes permissividades à replicação viral (SUZUKI et al., 2000).

As estirpes de aves e equinos ligam-se preferencialmente ao receptor 2-3 Gal (SA2-3Gal) do ácido siálico terminal, enquanto as estirpes humanas ligam-se ao receptor SA2-6Gal (ROGERS & PAULSON, 1983). A distribuição do ácido siálico nas membranas celulares das espécies animais determina a amplitude de hospedeiros (SUZUKI et al., 2000).

Cinco sítios antigênicos (A, B, C, D e E) estão localizados na região globular mais externa (H1) de cada monômero. O sítio de ligação ao receptor celular (ácido siálico) corresponde à localização B e forma uma bolsa em cada subunidade de H1. As bolsas são inacessíveis aos anticorpos e os aminoácidos (tirosina 98, triptofânio 153, histidina 183, ácido glutâmico 190 e leucina 194) componentes são muito conservados entre as estirpes. As especificidades entre os sítios de ligação e os receptores celulares diferem de acordo com os hospedeiros. Por exemplo, humanos, aves e equinos podem apresentar restrições às infecções interespecíficas. A H confere também capacidade de aglutinação ao muco do sistema respiratório (LAMB & KRUG, 1996).

A H é responsável pela penetração do vírus na célula hospedeira mas para que ocorra a fusão das duplas camadas lipídicas do envelope viral e célula hospedeira é necessário que a mudança conformacional da H ocorra no momento e no local certo para evitar que o peptídeo de fusão da H produza auto-aglutinação dos monômeros, é indispensável que vários trímeros de H adsorvam para assegurar a formação de um poro de fusão competente, além disso, a H requer um sítio trans-membrana para a completa fusão (LAMB & KRUG, 1996).

Uma região hidrofóbica de H2 torna-se exposta em pH ácido e forma a glicoproteína de fusão. As mudanças conformacionais na H em pH baixo resultam na exposição de alguns sítios e no sequestro de outros.

Apesar das modificações, a molécula mantém a estrutura trimérica e os sítios de combinação com o receptor mantêm os resíduos de ligação ao ácido siálico. As pontes dissulfídicas entre as subunidades H1 e H2 protegem a cabeça globular de H de mudança conformacional em pH ácido, que impediria a associação ao receptor celular (LAMB & KRUG, 1996).

A clivagem da molécula H0 em H1 e H2 é um pré-requisito para a mudança conformacional, que ocorre em pH ácido e, portanto, uma condição para a infecciosidade. As proteases de diversas células em cultivo *in vitro* foram comparadas com furina purificada, confirmando o papel da furina como ativadora da H para fusão (WALKER et al., 1994). Além da ativação da H pela furina, há outras proteases descritas exercendo papel maturador da H, esse grupo inclui as chamadas “tripsina-like” presente no trato digestivo e respiratório. Outro grupo é representado por endonucleases não específicas, que fazem a clivagem com múltiplos resíduos básicos próximos ao sítio de clivagem da H0 (WEBSTER et al., 1992; MO et al., 1997). A protease PC6 pode ativar o vírus influenza aviária virulentos *in vitro*, indicando que outras enzimas de clivagem da H possam estar presentes nos animais (HORIMOTO et al., 1994). A presença de lisina e arginina, faz com que a interação desses aminoácidos com as proteases permita a replicação viral em vários órgão e tecidos, o que explicaria a diferença em virulência e patogenicidade das amostras (WEBSTER et al., 1992; MO et al., 1997)

## 2.6. Neuroaminidase (N)

A N é codificada pelo segmento 6 do RNA (Quadro 1), sua estrutura é caracterizada por uma haste com uma porção globular na extremidade, tomando a forma de um cogumelo (Figura 3). A N é um tetrâmero homogêneo com 220.000 de peso molecular e pode ser removida do envelope viral por protease, condição em que aglutinam formando rosetas entre a haste e a cabeça. A N removida enzimaticamente do vírion retém a atividade enzimática e as propriedades antigênicas (BOSSART-WHITAKER et al., 1993).

A haste da N tem grandes variações em seqüência e número de aminoácidos (62 a 82), enquanto a cabeça pode apresentar homologia entre 42 e 57% entre subtipos de influenza A, com os resíduos de cisteína conservados

e conformação tridimensional semelhante (BOSSART-WHITAKER et al., 1993; LAMB & KRUG, 1996).

A atividade N está envolvida com a catálise de remoção dos açúcares de ácido siálico da H. Assim como ocorre com a H, a N também está sujeita à variações antigênicas e atua na hidrólise da ligação  $\alpha$ -cetosídica entre o ácido siálico terminal e uma D-galactose ou D-galactosamina adjacente. Anticorpos específicos contra a N não são neutralizantes, embora reduzam o tamanho das placas de efeito citopático (LAMB & KRUG, 1996).

O papel da N no ciclo biológico do vírus Influenza está ainda obscuro. A remoção do ácido siálico da H, da N e da superfície celular permite o transporte do vírus pela camada de mucina, permitindo ao vírus encontrar o seu receptor na membrana celular das células da mucosa. Algumas N (N1 e N9) têm atividade hemaglutinante além da enzimática (LAMB & KRUG, 1996). A região hidrofóbica da N tem o papel de direcionar a molécula para a membrana do RER e permite sua ancoragem estável no envelope. (BOSSART-WHITAKER et al., 1993; LAMB & KRUG, 1996).

## **2.7. Ciclo Viral**

### **2.7.1. Adesão**

A hemaglutinina é responsável pelo processo de adesão do vírus na célula hospedeira, devido a sua capacidade de reconhecer resíduos de ácido siálico na membrana celular. No processo de adesão, a neuroaminidase atua removendo resíduos de ácidos siálicos presentes em oligossacarídeos localizados próximos aos receptores celulares. Isto faz com que a hemaglutinina se ligue somente aos resíduos de ácidos siálicos que estejam presentes nos receptores celulares (MIKULÁŠOVÁ, VARECKOVÁ & FONDOR, 2000; WAGNER et al., 2002).

Após a adesão, o vírus sofre uma endocitose pela célula hospedeira, e dentro do endossoma que é ácido, a proteína de canal M2, presente no envelope, catalisa a entrada de íons  $H^+$  permitindo a acidificação no interior do vírus enquanto ele está passando pelo endossoma. Isso é necessário para que ocorram mudanças conformacionais no nucleocapsídeo,

permitindo a dissociação das ribonucleoproteínas da proteína de matriz M1(Figura 2) (HELENIUS, 1992; SKEHEL & WILEY, 2000).

A endocitose envolve receptores de manose, os quais são considerados os principais receptores de endocitose para os vírus influenza, para a internalização em macrófagos de camundongos. Uma invaginação forma-se em sítios tipo bolsa, recobertos pela clatrina na membrana. Após a internalização, o revestimento de clatrina é removido e a vesícula funde com endossomos que formam a série de organelas celulares de pH ácido crescente, cujo ambiente gerado por  $H^+$ -ATPases, promove o desnudamento das partículas virais. Compostos que alcalinizam o pH dos endossomos (cloreto de amônia; cloroquina) impedem o desnudamento do vírus influenza e outros vírus que utilizam a rota de endocitose, embora não tenham atividade antiviral. O papel da proteína M2 como canal iônico é essencial para o desnudamento do vírus influenza (HELENIUS, 1992; READING, MILLER & ANDERS, 2000).

Somente após esse processo as ribonucleoproteínas atingem o núcleo celular, local da transcrição e replicação viral (Figura 3) (HAY, 1998). A acidez do endossoma também promove mudanças conformacionais na H, levando a formação de dois polipeptídeos: H1 e H2 induzindo a atividade de fusão de membrana da H2. Existem evidências que a N também esteja envolvida nesse processo (HUANG et al., 1980).

### **2.7.2. Transcrição e Replicação do RNA**

Acredita-se que o aumento na concentração de NP livre dispare a mudança na síntese de RNAm para síntese de RNA complementar (RNAc) e RNA viral (RNAv). A replicação do RNAv começa com a mudança de síntese de RNAm para RNAc e culmina com a síntese de RNAv genômico que utiliza moléculas de RNAc como molde (Figura 2) (HONDA et al., 2001).

A introdução do RNAv no núcleo celular ocorre através dos poros da membrana nuclear ainda como complexo RNP. O RNA liberado para o núcleo celular é composto de 8 segmentos lineares e contém 10 genes. Cada segmento possui uma sequência conservada de 12 a 13 nucleotídeos nas extremidades 3' e 5', respectivamente. O RNAv é transcrito em dois tipos distintos de moléculas de RNA: o RNAm e o RNAc (MIKULÁŠOVÁ, VARECKOVÁ & FONDOR, 2000).

A polimerase viral associada às RNPs inicializam a síntese de RNAm, através da ligação do complexo RNA-polimerase à extremidade 5' do RNAv. O RNA viral é transcrito em RNAm a partir de um primer proveniente da célula hospedeira complementar a extremidade 3' de cada segmento do RNAv. Este *primer*, possui 9 a 17 nucleotídeos, é incorporado à extremidade 5' da nova molécula de RNAm sintetizada (HAY et al., 1977).

A transcrição é efetuada até que resíduos de uridinas são encontrados, 16 nucleotídeos antes da extremidade 5' do RNA viral, quando se encerra a transcrição e essa região serve de molde para a síntese de uma cauda poli A na extremidade 3' do RNAm (MIKULÁŠOVÁ, VARECKOVÁ & FONDOR, 2000).

O RNAc é utilizado como molde para produção de segmentos do genoma viral. Para que ocorra a síntese do RNAc não é necessária a presença de um *primer*, pois tanto o RNAv como o RNAc possuem uma adenosina trifosfatada na extremidade 5' de suas seqüências que funciona como inicializador (MIKULÁŠOVÁ, VARECKOVÁ & FONDOR, 2000).

A enzima RNA-polimerase-RNA-depende é constituída por três proteínas: PB1, PB2 e PA. A PB1 catalisa a adição de nucleotídeos nas cadeias de RNA, sendo responsável pelo processo de alongação do RNAm e a PB2 atua sobre as endonucleases permitindo a geração de *primers* que serão utilizados na síntese do RNAm. A função da polimerase PA na transcrição primária ainda não é conhecida, no entanto este polipeptídeo é necessário para a transcrição e replicação do RNAv (MIKULÁŠOVÁ, VARECKOVÁ & FONDOR, 2000).

### **2.7.3. Tradução**

Durante a infecção pelo vírus influenza ocorre uma dramática mudança de síntese protéica, de proteínas celulares para proteínas virais, comandados por processos nucleares e citoplasmáticos (Figura 2). Embora haja no núcleo a degradação das transcrições de RNAm celular, esse mecanismo não explica suficientemente a interrupção da tradução de RNAm celular, pois há muitos RNAm celulares funcionais no citoplasma. A interrupção da tradução dos RNAm celulares ocorre em 3 horas após a infecção de diversos tipos celulares. Não ocorre por degradação ou modificação do RNAm

celular, mas se deve à interrupção da iniciação e alongamento das traduções. A iniciação da tradução é seletiva e privilegia RNAm viral por serem muito eficientes os iniciadores desses (LAMB & KRUG, 1996)

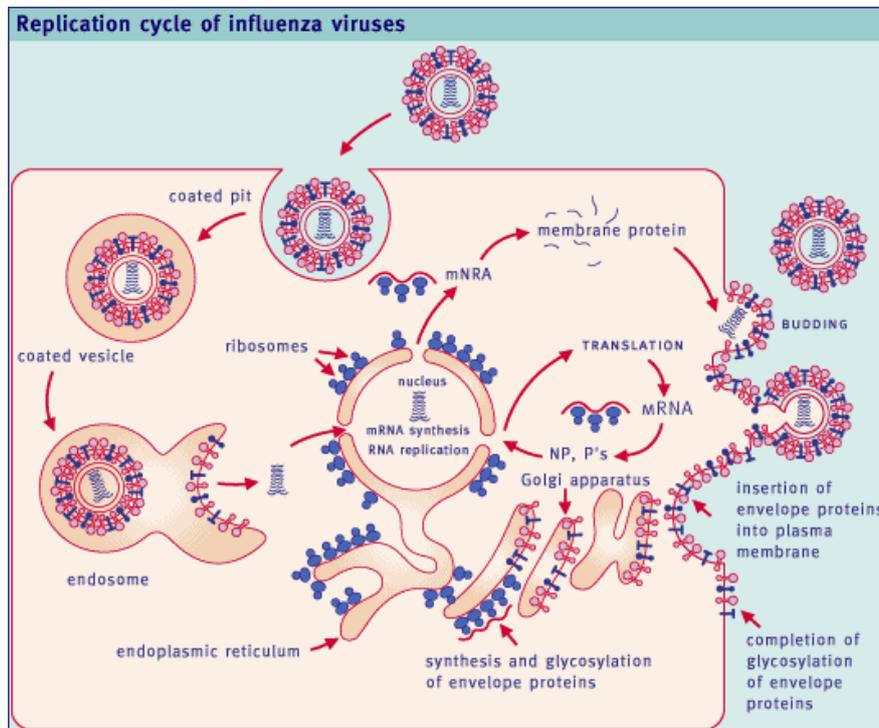
#### **2.7.4. Brotamento**

O mecanismo pelo qual as RNPs são transportadas para fora do núcleo não está muito claro, sabe-se apenas que é necessária a presença da proteína M1 (MARTIN & HELENIUS, 1991). A associação da proteína M1 com as RNPs no citoplasma impede a volta desta para o núcleo celular e a proteína NS2 facilita o transporte das RNPs para fora do núcleo (WHITTAKER, BUI & HELENIUS, 1996)

As proteínas de membrana após serem sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso são transportadas pelo complexo de Golgi para a superfície da membrana celular. As RNPs associadas à proteína M1 migram pelo citoplasma e brotam das células infectadas adquirindo a membrana lipídica com as glicoproteínas nelas inseridas (Figura 2) (HAY, 1998).

A liberação dos vírions após o envelopamento parece necessitar da ação da neuroaminidase, uma vez que vírions com neuroaminidase defectiva foram agregados e se reduz a liberação desses em cultura. Após o brotamento, a neuroaminidase remove os resíduos de ácido siálico presentes na mucosa, permitindo o acesso dos vírions a outras células do trato respiratório, garantindo disseminação do agente (LAMB & KRUG, 1996).

A figura abaixo (Figura 2) ilustra os processos de adsorção, desnudamento, transcrição, replicação, tradução e brotamento do vírus influenza.



**Figura 2.** Ciclo replicativo do vírus influenza (FIELDS et al., 1996).

## 2.8. Variações antigênicas e genômicas

O sucesso epidemiológico do vírus influenza deve-se ao surgimento de novas variantes antigênicas desse vírus, devido à elevada frequência de rearranjo genético e as conseqüentes modificações antigênicas nas glicoproteínas de superfície viral. O vírus influenza pode sofrer variações antigênicas como resultado de dois mecanismos diferentes: “drift” antigênico e “shift” antigênico (COUCH & KASEL, 1995).

A mutação antigênica menor (“drift”) resulta de alterações graduais no genoma do vírus por meio de mutações pontuais, incluindo substituição, deleção ou inserção de aminoácidos. Os “drifts” ocorrem devido à pressão imunológica e são responsáveis pela necessidade constante na atualização vacinal, visto que essas alterações tornam os organismos mais susceptíveis a infecções por novas cepas, já que os vírus são capazes de escapar dos anticorpos neutralizantes das cepas dos anos anteriores (COX & FUKUDA, 1998).

Essas mutações ocorrem todo ano ou em intervalos curtos de tempos, dentro de um mesmo subtipo do vírus influenza A. Estudos recentes demonstraram que uma alteração em apenas um sítio antigênico da molécula

de hemaglutinina pode alterar sua estrutura de forma que origine uma variação antigênica. Nos tipos B e C não há subtipos, mas pequenas variações antigênicas na H e N têm sido descritas no tipo B (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001).

Recentemente, mais uma barreira entre espécies foi rompida, o subtipo H3N8 que infectava eqüídeos infectou cães de corrida nos Estados Unidos. Nesse episódio não houve recombinação genética com outros subtipos virais, o genoma completo do vírus eqüino foi transmitido aos cães. As análises identificaram quatro diferenças de aminoácidos entre a hemaglutinina dos eqüinos e vírus canino, estas alterações foram, provavelmente, importantes na adaptação do vírus aos cães (CRAWFORD et al., 2005).

A mutação antigênica maior (“shift”) resulta de alterações drásticas através de rearranjos genéticos. Este processo pode ocorrer quando duas estirpes virais de diferentes origens infectam simultaneamente uma mesma célula hospedeira. Outra maneira de ocorrer o “shift” antigênico seria através da transmissão direta entre espécies diferentes, como ocorreu em 1989 e 1990 na China, quando foi verificada a transmissão de um vírus aviário para a população equina (GUO et al., 1992). Situação semelhante ocorreu em Hong Kong no ano de 1997, onde uma estirpe de vírus que infectava aves passou a infectar humanos. No entanto, a transmissão só se verificou de aves para humanos e nunca entre humanos. Se tal tivesse acontecido teríamos uma nova pandemia na história da humanidade (OIE, 2008a; 2008b).

Outra maneira possível de ocorrer o “shift”, é a reemergência de estirpes que já tenham circulado previamente entre a população, como aconteceu na Rússia em 1977, com a amostra H1N1. Nesses casos uma parcela considerável da população pode adoecer, visto que essas estirpes reemergente não serão reconhecidas pelo sistema imunológico (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001).

Nas análises filogenéticas do vírus influenza o gene que codifica a molécula de hemaglutinina é sempre escolhido como objeto de estudo, visto que esta é a principal proteína de superfície, responsável pela antigenicidade do vírus e apresenta a taxa de evolução maior do que os outros segmentos de genes virais, possivelmente em função da pressão seletiva exercida pelo sistema imunológico. A seleção imunológica é o principal fator na evolução do vírus influenza e na seleção de novas variantes (LAI et al., 2001).

Wilson, Skehel & Wiley (1981) observaram que a maioria das substituições nas sequências dos aminoácidos foi encontrada na região da cabeça globular da molécula de hemaglutinina, região mais externa e conseqüentemente mais exposta à pressão seletiva do sistema imune.

Esta variabilidade é o fator responsável pela contínua evolução de novas cepas e epidemias de Influenza, uma vez que a maioria da população não apresenta imunidade para as novas estirpes (COX & FUKUDA, 1998).

## **2.9. Imunologia**

### **2.9.1. Resposta celular**

A resposta celular ou inata é responsável pela proteção nos primeiros dias após a infecção. O mecanismo de resposta celular é muito importante, visto que uma vez iniciada a infecção, a resposta humoral não é capaz de eliminar o vírus. As células CD8+Tc e CD4+Th são as principais envolvidas no controle antiviral, eliminando as células infectadas por meio da ação de interferon  $\delta$ , levando-as à apoptose (STEVENSON & DOHERTY, 1998).

Os macrófagos exercem papel fundamental na resposta celular agindo como as primeiras células da linha de defesa do organismo. Uma vez ativados, os macrófagos são cruciais para resposta imune específica e inespecífica e desempenham papel importante como mediadores da resposta inflamatória (PESCHKE et al., 1993).

Os macrófagos atuam estimulando a produção de citocinas e englobando partículas virais através da fagocitose. A atividade fagocitária dos macrófagos é extremamente importante na eliminação de células que sofreram apoptose, na apresentação do antígeno aos linfócitos T ou pela sua destruição pelos fagolisossomas (PESCHKE et al., 1993).

Os mecanismos que envolvem a depressão dos macrófagos na influenza ainda não foram esclarecidos, no entanto essa supressão pode predispor o organismo infectado à infecção bacteriana secundária (LARSON, PARRY & TYRRELL, 1980; ABRAMSON et al., 1982).

Na infecção pelo vírus influenza ocorre um aumento na atividade do fator de crescimento tumoral (TGF- $\alpha$ ). O TGF é secretado por vários tipos

celulares, incluindo macrófagos de todas as espécies animais (SCHULTZ-CHERRY & HINSHA, 1996). O TGF atua como agente imunossupressor, ataca e regula molécula inflamatória, induz a secreção de citocinas e estimula as células T-Helper tipo 1 (WAHAL, 1992).

Interferon (INF) produzido pela célula infectada induz a síntese de numerosas proteínas da célula hospedeira, incluindo uma família de proteínas denominada Mx [100]. A proteína Mx se acumula em grandes níveis em células tratadas com INF-1 ou infectadas pelo vírus influenza. Em camundongos a expressão da proteína Mx confere grande resistência ao vírus influenza *in vitro* (STAEHLI, 1990; PAVLOVIC et al., 1990) e *in vivo* (RUFF, 1983; STAEHLI & HALLER, 1987), no entanto esse mecanismo de resistência ainda não está muito esclarecido. Proteínas virais não são observadas nas células Mx submetidas ao tratamento por IFN-1, sugerindo a existência de uma deficiência na replicação viral (HORISBERGER, HALLER & ARNHEITER, 1980).

O vírus influenza é sensível ao interferon, e no início do aparecimento dos sintomas é possível detectar interferon tanto nas secreções respiratórias quanto no soro (MURPHY & WEBSTER, 1996).

### **2.9.2. Resposta humoral**

A resposta humoral ou adquirida ocorre após a resposta celular e consiste na produção de anticorpos sistêmicos (IgM e IgG) e anticorpos de superfície (IgA) contra a hemaglutinina, neuroaminidase, NP e a proteína M do vírus influenza (MURPHY & WEBSTER, 1996; MUMFORD & CHAMBERS, 1998).

O primeiro anticorpo produzido é o IgM, que aparece no início da infecção e tem a função de localizar a infecção, a imunoglobulina IgM atinge a circulação e liga-se de forma específica ao vírus, na tentativa de impedir a disseminação da infecção. O segundo anticorpo a aparecer é o IgG, ainda mais específico, por ser menor que a molécula de IgM sofre diapedese e ataca o vírus quando este já atingiu o tecido, porém não consegue atuar em mucosas. Surge cerca de 12 dias após a infecção. O terceiro anticorpo é o IgA, que age em locais onde nenhum outro anticorpo consegue atuar, como as mucosas. Ainda, oferece defesa contra reinfecção em pontos estratégicos do organismo

(portas de entrada) (MURPHY & WEBSTER, 1996; MUMFORD & CHAMBERS, 1998).

As variações antigênicas nas principais glicoproteínas de superfície resultam em alterações no genoma viral. Essas alterações fazem com que os anticorpos se tornem ineficazes, visto que a imunidade adquirida pelos anticorpos se restringe aos subtipos antigenicamente semelhantes. Uma exceção é a IgA, a qual é eficiente na proteção contra vírus influenza antigenicamente distintos (LUNN et al., 1999), o mesmo ocorre na imunidade celular que produz proteção cruzada entre subtipos antigenicamente distintos (MURPHY & WEBSTER, 1996; MUMFORD & CHAMBERS, 1998).

Considerando que a imunidade adquirida após infecção natural é mais eficiente e duradoura que a imunidade induzida por um estímulo vacinal e que no local da infecção, são produzidos principalmente anticorpos da classe IgA, acredita-se que a IgA seja a principal responsável por essa imunidade duradoura (HANNANT, MUMFORD & JESSET, 1988).

No soro encontram-se IgM, IgA e principalmente IgG. Um estudo experimental demonstrou que enquanto uma infecção natural estimula a produção de IgG<sub>(a)</sub>, IgG<sub>(b)</sub> e IgA, a resposta vacinal induz a produção quase que exclusivamente de IgG<sub>(t)</sub> (SLEPUSHKIN et al., 1995; MUMFORD & CHAMBERS, 1998).

A resposta humoral mais específica se baseia na produção de anticorpos contra a hemaglutinina e a neuroaminidase. Os anticorpos anti-hemaglutinina inibem a ligação dos vírus à membrana da célula hospedeira e os anticorpos produzidos contra a neuroaminidase impedem que as partículas virais recém-sintetizadas sejam liberadas da célula infectada, evitando a disseminação da infecção (THOMAS et al., 1998).

Os anticorpos produzidos contra a neuroaminidase apresentam menor importância quando comparado aos anticorpos anti-hemaglutinina. No entanto, estudo realizado por Chen e colaboradores (1999) demonstrou que camundongos imunizados com vacina de DNA contendo genes de hemaglutinina e neuroaminidase apresentavam resposta imunológica satisfatória.

Anticorpos direcionados a proteína M2 em camundongos não conferem proteção completa, mas promovem redução na taxa de eliminação de partículas virais por célula infectada e proteção parcial contra a enfermidade

(SLEPUSHKIN et al., 1995; FRANCE et al., 1999). A principal vantagem dos anticorpos anti-proteína M2 quando comparados aos anticorpos contra hemaglutinina e neuroaminidase é que estes apresentam maior eficiência imunológica, visto que a proteína M2 encontra-se conservada em todos os subtipos de influenza A (SLEPUSHKIN et al., 1995).

## **2.10. Transmissão interespécie**

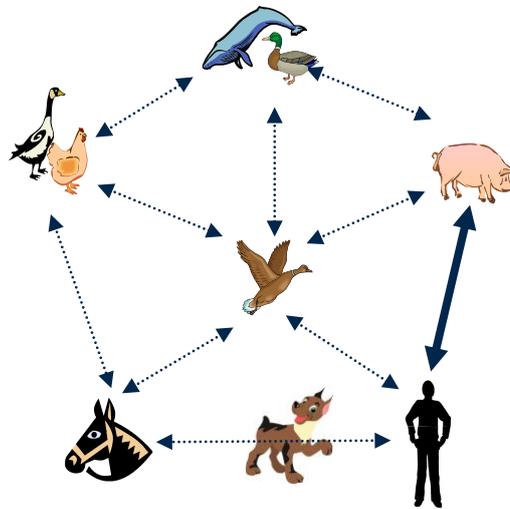
Vários animais estão envolvidos na epidemiologia da influenza, apresentando importante papel no surgimento de amostras pandêmicas. Amostras virais tipo A são encontradas em eqüinos, suínos e em diversas espécies de aves, tanto silvestres como domésticas (COUCH & KASEL, 1995) e recentemente descrita em cães (CRAWFORD et al., 2005), incluindo mais um hospedeiro mamífero na complexa cadeia epidemiológica do vírus influenza (Figura 3).

Outras espécies como martas, leões marinhos e baleias são infectadas ocasionalmente, no entanto não há evidências do estabelecimento do vírus influenza nessas espécies (HINSHAW, 1998).

Horimoto & Kawaoka (2001) sugeriram que todas as linhagens do vírus influenza encontradas em mamíferos originaram de um ancestral aviário e posteriormente se estabeleceram nas respectivas espécies animais.

Uma das dificuldades para o controle da disseminação dos vírus Influenza se dá pela existência de diversos reservatórios animais (Figura 3), especialmente aves e mamíferos, possibilitando o reagrupamento entre genes de vírus que infectam seres humanos e animais (COX & SUBBARAO, 1999).

A figura apresentada a seguir demonstra a complexidade da cadeia epidemiológica do vírus influenza, os diversos reservatórios animais e as possíveis transmissões interespécies (Figura 3)



**Figura 3.** Cadeia epidemiológica do vírus influenza (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001).

### 2.10.1. Aves

O vírus da influenza aviária é comumente encontrado em uma grande variedade de aves domésticas e silvestres, sendo esta última e as aves aquáticas os principais reservatórios do vírus influenza tipo A, que ocasionalmente causa infecção severa ou inaparente em outros animais, como suínos, eqüinos, cães, gatos e até humanos (HINSHAW & WEBSTER, 1982; HINSHAW et al., 1984; FOUCHIER et al., 2004; HEINEN, 2003; KUIKEN et al., 2004; AMONSIN et al., 2007).

Pelo fato de albergarem todos os subtipos de neuroaminidase e hemaglutinina existentes, as aves aquáticas, funcionam como reservatórios naturais do vírus influenza tipo A (ZHOU et al., 1999).

Os vírus influenza A estão adaptados a patos e outras espécies aquáticas, entretanto no mundo foram feitos isolamentos a partir de aves migratórias na Rússia (LVOV & ZHDANOV, 1987), na China (SHORTRIDGE, 1982), no Japão (YAMANE, ODAGISI & ARIKAWA, 1978), na Europa (HANNOUN & DEVAUX, 1980; BROWN, 1996), na América do Norte (HINSHAW et al, 1978; JANKE, 1997), na Austrália (MACKENZIE et al., 1984) e no Brasil (SALCEDO, 1980; COUCEIRO, 1986; COUCEIRO, COUCEIRO & MACHADO, 1987; GOLONO, 2009).

Tanto os patos domésticos quanto selvagens são infectados e existem evidências que diferentes espécies de patos são susceptíveis. Na sua

totalidade as diferentes espécies de aves aquáticas que podem servir como reservatório para o vírus influenza não estão bem definidas e potencialmente incluem ainda outras ordens de aves. Os membros das ordens Procellariiformes, Pelecaniformes, Anseriformes, Galiformes, Ciconiformes, Gruiformes e Charadriiformes, pertencem a famílias das quais já foram realizados isolamentos dos vírus influenza (NICHOLSON, WEBSTER & HAY, 1998).

A maioria dos estudos da Influenza em aves aquáticas tem sido feitos em patos, devido à capacidade de adaptação do vírus a essa espécie animal, onde eles se replicam nas células do trato intestinal e são excretados em altas concentrações nas fezes sem provocar injúria ao hospedeiro. O vírus influenza tem sido isolado de fezes frescas depositadas nas margens dos lagos e em baixas concentrações nas águas desses lagos (WEBSTER & BEAN Jr., 1998).

Embora todos esses subtipos sejam encontrados em espécies aviárias somente 3 subtipos de hemaglutinina: H1, H2 e H3 (COX & FUKUDA, 1998) e 2 subtipos de Neuraminidase: N1 e N2 (LAMB & KRUG, 1996) estão associados às epidemias e às pandemias de influenza em humanos a partir de 1889.

O vírus da influenza aviária está classificado em dois grupos: vírus altamente patogênico (Highly Pathogenic Avian Influenza - HPAI) e de baixa patogenicidade (Low Pathogenic Avian Influenza – LPAI), baseado nas características genéticas do vírus e na severidade da doença, definida principalmente pelo grau de mortalidade das aves infectadas. Até o presente momento apenas os subtipo H5 e H7 são considerados altamente patogênicos, os demais subtipos causam apenas sintomas brandos, em sua maioria atacam o sistema respiratório e são conhecidos como de baixa patogenicidade para as aves (ALEXANDER, 2000; EASTERDAY, et al., 1997; OIE, 2008a).

Segundo Schöll (2005), o vírus também, pode passar de baixa para alta patogenicidade, conforme ocorreu nos Estados Unidos, em 1983, com o subtipo H5N2 e na Itália, em 1999, com o subtipo H7N1. Nos dois casos os vírus eram, inicialmente, de baixa patogenicidade, mas tornaram-se altamente patogênicos alguns meses depois.

No ano de 1997 uma ameaça de pandemia alertou o mundo: a Gripe das Aves, causada por uma variante do vírus influenza (H5N1) anteriormente detectado apenas em aves e que passou a infectar humanos. A

origem do H5N1 recai sobre as aves selvagens que teriam infectado com esse vírus a população de aves domésticas. Em apenas 3 dias 1,5 milhões de aves em granjas morreram ou foram sacrificadas, 100% da população de aves comerciais de Hong Kong foi destruída e 30% dos casos humanos foram fatais (ZHOU et al., 1999; WHO, 2006a).

Após seis anos de trégua, uma nova onda da doença atingiu Hong Kong, infectando 3 pessoas de uma mesma família e vitimando 2, desde então o subtipo H5N1 não parou de causar infecção em humanos. Atualmente é considerado endêmico na Ásia e na África, em especial no Egito. Este subtipo encontra-se bem adaptado em aves domésticas, foi descrito em mamíferos como, os cães, gatos domésticos, leopardos, tigres, martas e civetas (KUIKEN et al., 2004; YINGST, SAAD & FELT, 2006; AMONSIN et al., 2007) e apesar de ser de difícil transmissão para seres humanos, sua exposição constante aos trabalhadores rurais e nos mercados asiáticos e africanos eleva às chances de ocorrer uma adaptação viral a espécie humana e assim, se tornarem mais eficientes na transmissão de pessoa a pessoa podendo desencadear uma nova pandemia (OIE, 2008a,b; WHO, 2009a).

Entre os anos de 2003 e 2010, ocorreram vários surtos envolvendo o subtipo H5N1 em diversos países da Ásia, Europa e África, América do Norte com milhões de aves domésticas indo a óbito ou sendo sacrificadas gerando prejuízos de bilhões de dólares (CAPUA & ALEXANDER, 2004). Esse contexto tem gerado grandes preocupações tanto para os setores econômicos diretamente afetados como para as autoridades públicas brasileiras, uma vez que o segmento avícola é de grande importância para o Brasil e o vírus pode representar um risco para saúde pública. Em termos econômicos a situação é preocupante, principalmente em função dos reflexos desse tipo de evento sobre a produção, consumo doméstico e exportações de produtos avícolas. Além das perdas com a mortalidade das aves na região do foco, gastos públicos para controle, fiscalização e desinfecção (WHO, 2006a; WHO, 2006b).

Devido às aves selvagens serem o reservatório natural de todos os subtipos da influenza tipo A e aliada a possibilidade destes vírus serem transmitidos às aves comerciais, aos humanos e causar prejuízos econômicos, vários países estão realizando o monitoramento em aves selvagens e comerciais. O monitoramento permite traçar a prevalência dos subtipos nas

populações aviárias, suas características patogênicas e antigênicas, além disso, essas medidas são importantes para identificação de subtipos com potencial epidêmico ou pandêmico (SOARES et al., 2005).

Conforme destacado pelo Plano Nacional de Contingência para influenza aviária, o Brasil é visitado periodicamente por milhões de aves migratórias, que em sua rota passam por vários países do mundo e, assim, podem transmitir o vírus influenza a populações distantes. Diversas aves que procriam no Brasil, migram para outras localidades no período de descanso reprodutivo, favorecendo a disseminação do vírus para populações não migratórias no Brasil e países vizinhos. Várias aves que se reproduzem em outros países, também, migram para o Brasil em busca de alimento (BRASIL, 2007).

Foram registradas, no Brasil, 152 espécies de aves que visitam o país regularmente, sendo que 101 espécies são de aves aquáticas, o principal reservatório do vírus influenza. Das, 152 espécies de aves visitantes, 91 são oriundas do hemisfério norte, outras 61 espécies chegam ao Brasil proveniente de países do hemisfério sul e da Antártica. O Brasil possui 2 rotas migratórias importantes: a do Atlântico e do Mississipi, a primeira liga a região ártica do mundo ao litoral brasileiro e a segunda passa pela mesma região ártica e segue em direção ao interior do país (SICK, 2001; BRASIL, 2007). Além disso, já foi verificado que aves domésticas e migratórias presentes em diversas partes do território brasileiro albergam subtipos de baixa patogenicidade do vírus influenza aviária, alertando para possibilidade da forma mais agressiva chegar ao Brasil e se disseminar entre a população aviária (KAWAMOTO et al., 2005; BRENTANO, CIACCI-ZANELLA & MORES, 2005; GOLONO, 2009).

Em março de 1999 mais um subtipo relacionado à influenza aviária, H9N2, rompeu a barreira interespecie e infectou humanos em Hong Kong, apesar do quadro brando de gripe apresentado pelos humanos, este subtipo através de recombinação foi o doador de genes para que proteínas internas do vírus H5N1 fossem codificadas (BUTT et al., 2005; MONNE et al., 2007). O subtipo H9N2 está relacionado com surtos de influenza aviária em diversas partes do mundo e recentemente foi identificado causando doença respiratória, paralisia e morte em suínos na China (CONG et al., 2007; MONNE et al., 2007; NAEEM et al., 2007). A transmissão do subtipo H9N2 foi verificada

entre aves domésticas, suínos e o homem, no entanto a transmissão horizontal entre humanos não foi observada (KATZ, 2003).

Em 2003, na Holanda, o subtipo H7N7, de origem aviária que não havia sido encontrado em seres humanos, foi detectado em 89 pessoas e causou, na maioria dos infectados, um quadro de conjuntivite. No entanto, duas pessoas desenvolveram quadro respiratório com sintomatologia característica de gripe e uma foi a óbito devido a complicações pulmonares (FOUCHIER et al., 2004).

### **2.10.2. Suínos**

A influenza é a doença respiratória mais comum entre os suínos. Os surtos são geralmente multifocais, sempre aparecem associados ao manejo deficiente e a contaminação bacteriana, envolvendo diferentes agentes patogênicos (BRENTANO et al., 2002) e são descritos principalmente no inverno, em diversas partes do mundo, incluindo a Europa, Ásia, África e as Américas (ESTERDAY & VAN REEYH, 1990; OIE, 2008a, OIE, 2008b).

A infecção pelo vírus da influenza suína se caracteriza por sintomas como: tosse, descarga nasal, febre alta, depressão, letargia, dificuldade respiratória, taquipnéia, perda de apetite. Entre os agentes que podem causar doença respiratória em suínos estão o vírus da síndrome reprodutiva e respiratória suína, doença de Aujeszky (pseudorraiva), o coronavírus respiratório, *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Mycoplasma hypopneumoniae*, no entanto a maioria dessas infecções respiratórias cursam com sintomas característicos que não são observados na influenza. Somente a infecção aguda pelo *Actinobacillus pleuropneumoniae* apresenta sintomas idênticos aos observados nos episódios de gripe (OIE, 2008a)

Existem duas formas da doença a endêmica e a epidêmica, na primeira os sintomas são brandos e nem todos os animais infectados apresentam os sinais clínicos da enfermidade. A forma epidêmica é mais severa, no entanto, se não existirem fatores complicantes, como infecções bacterianas secundárias, a recuperação ocorre de forma rápida (OIE, 2008a)

Os subtipos mais difundidos e adaptados entre os suínos são o H1N1 e H3N2. Outros subtipos, como o H1N7, H3N1, H4N6, H3N3 e H9N2 têm sido identificados entre os suínos com menor incidência (BROWN et al., 1997;

HEINEN et al., 2001; PEIRIS et al., 2001; KARASIN et al., 2002; OLSEN et al., 2005). Variações antigênicas e genômicas foram observadas entre os subtipos H1N1, H1N2 e H3N8 isolados no continente americano e europeu (CASTRUCCI et al., 1993; BROWN et al., 1997; DONE & BROWN, 1997; KARASIN et al., 2004).

A influenza suína foi observada pela primeira vez em 1918. Em 1919 ocorreu uma pandemia na Hungria e na China afetando suínos e humanos. Estudos retrospectivos demonstraram que o subtipo H1N1 esteve envolvido nos dois episódios e que tinha sido transmitido aos suínos pelos humanos (WEBSTER et al., 1992).

Inquérito epidemiológico no Reino Unido revelou que 14% da população suína já havia tido contato com os subtipos H1N1 e H3N2 (BROWN, 2000). No Brasil, um estudo sorológico realizado em 7 municípios do Estado do Rio de Janeiro apresentou positividade de 81% e 6% frente os subtipos H1N1 e H3N2 respectivamente (MOTA et al., 2002).

Oliveira Júnior (2004) realizou um levantamento soro epidemiológico para verificar a prevalência desses subtipos nas grandes regiões produtoras de suínos no Estado de Mato Grosso do Sul e observou 60% de reatividade com títulos entre 10 e  $\geq 80$  para os subtipos H1N1, H3N2 ou para ambos, determinando a potencialidade dos suínos como reservatório desses agentes. Os resultados obtidos pelo presente estudo demonstraram que as taxas de ocorrência de anticorpos para o vírus da Influenza foram proporcionais às densidades demográficas de suínos e humanos bem como o afluxo de pessoas em cada uma das regiões estudadas, e destacaram a importância das grandes áreas de nidificação de aves migratórias existentes no Estado de Mato Grosso do Sul oriundas do hemisfério norte (MARQUES, NASCIMENTO & UETANABARO, 1996).

Não é comum a infecção de humanos pelo vírus da influenza suína, no entanto a literatura descreve alguns surtos e casos esporádicos de infecções em humanos pelo vírus suíno, incluindo principalmente os tratadores e pessoas que possuem contato direto com os suídeos. Outra possibilidade é a transmissão do vírus da influenza humana ao suíno (OIE, 2008a; 2008b; FAO, 2009).

Todos os vírus influenza reconhecem oligossacarídeos que contêm um terminal de ácido siálico presente em receptores celulares e o tipo

de ligação existente nesses terminais irá determinar a especificidade da hemaglutinina, restringindo à transmissão entre espécies (ITO & KAWAOKA, 1998).

Os vírus da influenza aviária e equina têm predileção em se ligar ao ácido N-acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,3-galactose, ao contrário, o vírus humano tem preferência pelo ácido N-acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,6-galactose. Células do epitélio traqueal humano contêm N-acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,6-galactose e não acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,3-galactose, o contrário ocorre com as células epiteliais do intestino das aves (ROGERS & PAULSON, 1983).

Os suínos por sua vez apresentam em suas células do epitélio traqueal ambos ácidos N-acetilneuroamínico ( $\alpha$ 2,3 e  $\alpha$ 2,6), permitindo a esta espécie animal infectar-se por um vírus de origem aviária, equina e/ou humana. Neste caso pode ocorrer um rearranjo genético entre os vírus e um novo subtipo pode ser originado (HINSHAW et al., 1981; KIDA et al., 1994).

Como foi visto anteriormente a transmissão do vírus aviário para humanos é restrita, o mesmo não ocorre com os suínos que atuam como hospedeiros intermediários originando, através de rearranjos genéticos, subtipos virais contendo genes aviários com capacidade de infectar humanos e outros mamíferos (WEBSTER et al., 1992; WEBSTER, 2002) (Figura 4A). Essa suspeita foi reforçada por Claas e colaboradores (1994) quando uma criança foi infectada por um vírus originado de um rearranjo genético ocorrido em suíno, entre amostra aviária (H1N1) e humana (H3N2).

Outra forma do suíno desempenhar o papel de hospedeiro intermediário é modificando a especificidade de ligação do vírus aviário, adaptando-os aos humanos (Figura 4B) (ITO et al., 1998).

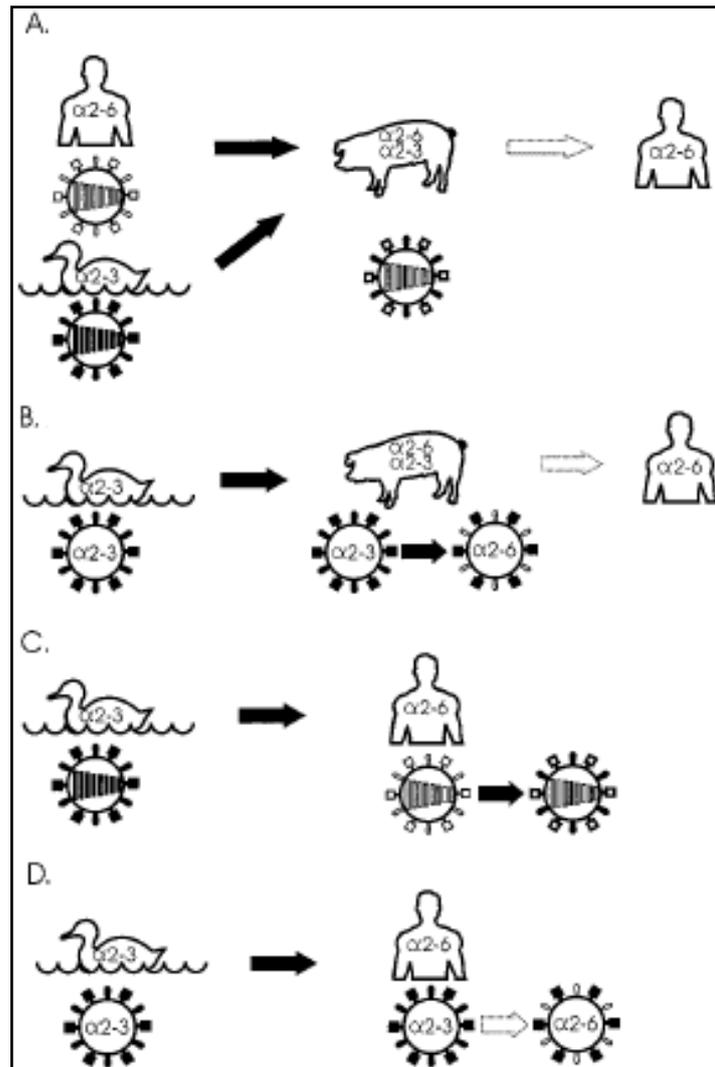
Dado a este potencial e o fato dos suínos viverem com muita proximidade dos produtores, no sudeste da Ásia, algumas vezes, mesmo dividindo a mesma moradia e o suprimento de água, podem explicar como as pandemias dos tempos recentes têm sempre se originado dessa parte do mundo. Os suínos e os patos, geralmente, mantêm um contato direto em campos de arroz e em especial na prática de criação de peixes na Ásia realçando assim o contato interespecies e o potencial de co-infecção dos suínos (SCHOLTISEEK, 1990).

A transmissão direta do vírus de aves para humanos foi observada em 1997 em Hong Kong pela primeira vez (ZHOU et al., 1999). Tal

fato pode ter ocorrido pelo rearranjo de amostras aviárias e humanas no próprio homem (Figura 4C), ou pela adaptação do vírus aviário, alterando sua especificidade de ligação, tornando-se capaz de infectar humanos (Figura 4D) (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001).

Inicialmente a amostra pandêmica H1N1 isolada em 2009 foi denominada “swine flu”, acreditava-se que a amostra havia rompido a barreira interespecie e infectado humanos, no entanto estudos preliminares demonstraram que anticorpos produzidos por suínos nos U.S. não conferiam imunidade frente à amostra pandêmica e rapidamente a Organização Mundial de Saúde renomeou a amostra que passou a ser conhecida como H1N1/2009. Concomitante a infecção em humanos foi descrito no Canadá a infecção de suínos que foram contaminados por um dos tratadores que havia retornado do México, também foram descritos casos em suínos na Argentina e no México, mas não foi possível atribuir ao suíno o papel de transmissor desse subtipo ao homem (WHO, 2009b; FAO, 2009).

Estudos antigênicos e genômicos identificaram a amostra de 2009 (A/Califórnia/04/2009) como uma nova variante do vírus influenza (H1N1) oriunda do rearranjo genético de quatro diferentes estirpes de vírus influenza, uma humana, outra aviária e duas de origem suína que não havia sido detectada previamente entre humanos ou suínos (WHO, 2009b; FAO, 2009).



**Figura 4.** Mecanismos de surgimento de novas variantes do vírus influenza com caráter pandêmico (HORIMOTO & KAWAOKA, 2001)

### 2.10.3. Equinos

A influenza eqüina é causada por dois distintos subtipos do vírus Influenza A: Equine-1, vírus H7N7 (SOVINOVA et al., 1958) e Equine-2, vírus H3N8 (WADDELL, TEIGLAND & SIGEL, 1963).

Desde 1980, não há confirmação de influenza eqüina causada pelo subtipo H7N7, no entanto há evidências sorológicas da permanência desse vírus na população eqüina (WEBSTER, 1993; OLIVEIRA, 2005). Por outro lado, o subtipo H3N8 é o responsável por freqüentes epidemias e endemias respiratórias em todo o mundo. Os dois subtipos do vírus Influenza

são imunologicamente distintos, desta forma infecções naturais e vacinação contra um determinado subtipo não conferem imunidade ao outro (TUMOVA, 1980), por essa razão vacinas contendo os dois subtipos, vêm sendo usadas em diversos países (NICHOLSON, WEBSTER & HAY, 1998).

A transmissão entre aves e eqüinos foi evidenciada com o surgimento de dois surtos ocorridos na China, em 1989 e 1990, onde foram isolados vírus influenza, subtipo H3N8, altamente patogênico para equinos. Através de provas moleculares, identificou-se que esse vírus teve origem aviária e que ambos os isolados eram genômicamente e antigenicamente distinto da amostra protótipo (A/equine/Miami/63) (GUO et al., 1992).

No surto ocorrido na China em 1989 observou-se uma alta taxa de mortalidade (20%) muitas vezes associada a uma enterite, sintomatologia atípica em infecções pelo vírus influenza em mamíferos. A amostra isolada neste surto foi denominada A/equine/Jilin/1/89. O surto de 1990 foi mais brando e não houve nenhum óbito, o vírus isolado neste surto (A/equine/Heilongjiang/15/90) era semelhante antigenicamente ao isolado em 1989, justificando a baixa taxa de mortalidade, visto que parte da população eqüina apresentava anticorpos contra esse agente (GUO et al., 1992).

O primeiro surto de influenza eqüina, subtipo H3N8, descrito no Brasil ocorreu em 1963, no Estado de São Paulo (ANDREWS, PEREIRA & WILDY, 1978). No Estado do Rio de Janeiro, foram descritos surtos de influenza eqüina em 1969, 1976, 1985 e 2001 (CUNHA, 1970; CUNHA, PASSOS & VALLE, 1978; CUNHA et al., 1986; LOUREIRO, 2004). No surto de gripe ocorrido em 2001 animais vacinados foram acometidos (LOUREIRO, 2004) nos quatro episódios, o subtipo H3N8 esteve envolvido.

Inquérito sorológico realizado em 1985 demonstrou que o vírus influenza subtipo H3N8 estava difundido por várias regiões do Brasil, apresentando uma positividade de 41,22% na região Norte, 24,79% na região Nordeste e 42,06% na região Sudeste. Em 2002, Loureiro e colaboradores verificaram uma porcentagem de 27% ao avaliar sorologicamente eqüídeos não vacinados, no decorrer do ano de 2001, no Estado do Rio de Janeiro.

Estudo epidemiológico mais abrangente realizado em 2005 analisou 1000 soros provenientes, da sangria realizada em eqüídeos não vacinados no período de 2000 a 2004 frente os subtipos H7N7 e H3N8, linhagem americana e linhagem européia. Os resultados confirmaram a

circulação do subtipo H7 e H3 entre os eqüídeos no Estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA, 2005).

Diel e colaboradores (2006) avaliaram a circulação do vírus influenza (H3N8) em eqüinos oriundos de 65 municípios do Estado do Rio Grande do Sul e obtiveram uma prevalência de 65,4% e a detecção de pelo menos um animal reagente em 55 municípios amostrados (84,6%) sugeriu a ampla disseminação do agente também no rebanho eqüino do Rio Grande do Sul.

Em 2005 o subtipo H3N8 rompeu a barreira interespecie ao infectar cães nos Estados Unidos, o que levou as autoridades sanitárias na América do Norte, ao risco da possibilidade de uma evolução adaptativa do vírus ao novo hospedeiro, devido ao estreito contato do homem com os cães (CRAWFORD et al., 2005).

O vírus da influenza eqüina produz uma síndrome respiratória, que afeta eqüinos de todas as idades e cuja distribuição é mundial sendo considerada uma doença exótica na América do Norte. Somente Nova Zelândia e Islândia que continuam livres da doença (OIE, 2008a). Essa infecção surge após um breve período de incubação de 24 a 72 horas, durando em torno de 3 a 7 dias, apresentando uma alta morbidade (95-98%) e baixa mortalidade.

O transporte de animais, sem o devido controle são fatores determinantes na disseminação da Influenza Eqüina, por essa razão a epidemiologia da influenza eqüina está diretamente relacionada com o regime em que são criados os eqüinos nos diferentes países (MUMFORD & CHAMBRES, 1998).

Em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, a maioria dos eqüinos, são utilizados como meio de transporte e tração animal, raramente recebem assistência veterinária, vivem em más condições zootécnicas e muitos não são vacinados contra influenza. Nesses países os surtos ocorrem de forma mais severa, as taxas de morbidade são altas e são elevadas as infecções bacterianas secundárias podendo levar à morte um número considerável de animais (MUMFORD & CHAMBRES, 1998).

Em países desenvolvidos normalmente os cavalos são utilizados em competições, esportes e lazer, conseqüentemente possuem um alto valor comercial e zootécnico, recebem cuidados veterinários necessários, assim como um esquema vacinal completo. Em função disso, as infecções por

influenza nesses animais são normalmente mais brandas, eles se recuperam rapidamente sem apresentar muitas complicações (MUMFORD & CHAMBRES, 1998).

Os surtos de influenza eqüina não seguem uma variação sazonal, como acontece com os surtos na população humana. Normalmente ocorrem com a importação de animais infectados como ocorreu na África do sul (1986), Índia (1987), China (1992) (KAWAOKA & WEBSTER, 1989; LAI, LIN & POWELL, 1994).

Animais vacinados podem se infectar, desenvolver a doença de forma subclínica e se um exame clínico detalhado não for realizado, o vírus pode se difundir rapidamente e afetar uma população susceptível, com conseqüências desastrosas (KAWAOKA & WEBSTER, 1989; LAI et al., 1994).

#### **a) A influenza eqüina e o homem**

A Influenza é uma doença respiratória altamente contagiosa, aguda e é responsável a cada ano por epidemias locais, regionais, ou mundiais. Por causa desta ameaça contínua à saúde pública, a vigilância é a única ferramenta apropriada para detectar a aparição de novos surtos e adotar estratégias para evitar conseqüências dramáticas da disseminação de novas cepas. Nenhuma outra doença febril aguda com sintomas respiratórios pode se espalhar assim tão rapidamente a um grande número países (PAIVA et al., 2001).

Por essa e outras razões a relação do vírus da influenza eqüina com humanos é de grande importância e por isso vêm sendo realizados estudos na tentativa de se estabelecer qual o papel exercido por esse agente na cadeia epidemiológica da influenza humana (PAIVA et al., 2001).

Concomitante ao surgimento do subtipo H3 de influenza eqüina em 1963, ocorreu uma epidemia em humanos em 1968, causada pelo mesmo subtipo, levantando a hipótese de que a influenza H3 humana e eqüina estivessem relacionadas. Estudos sorológicos realizados em 1958 indicaram que a influenza eqüina (H3N8) tinha circulado em humanos (MINUSE et al., 1965; SCHILD & STUART-HARRIS, 1965), sugerindo que pudessem ocorrer recombinações entre amostras humanas e eqüinas resultando em um novo vírus de influenza humana (KILBOURNE, 1968; LAVER & WEBSTER, 1973).

Apesar do seqüenciamento da amostra ter comprovado que esta tinha sido derivada de um ancestral aviário, a possibilidade de transmissão entre eqüinos e humanos não foi descartada (BEAN et al., 1992).

Infecções experimentais com o vírus influenza eqüina realizadas em humanos demonstraram que o homem não desenvolve a doença quando exposto ao vírus, no entanto foi possível realizar o isolamento viral e detectar a presença de anticorpos nos pacientes infectados (KASEL et al., 1965 *apud* MOIRIGNOT, 1977). Posteriormente descobriu-se que os anticorpos produzidos contra o vírus da influenza equina conferiam uma certa imunidade contra o vírus humano, sugerindo a existência de uma possível reação cruzada entre ambos (COUGH & DOUGLAS, 1969 *apud* MOIRIGNOT, 1977).

Alexander & Brown (2000) destacam a possibilidade de infecção humana pelo subtipo H3N8, embora esse subtipo não se caracterize como um agente adaptado à espécie humana, foram observadas infecções eventuais e subclínicas em pessoas que manipulavam esse vírus em laboratório, representando um potencial risco biológico para esses trabalhadores.

Estudo sorológico realizado na Nigéria demonstrou que 87% dos equinos responderam positivamente ao vírus influenza humano A(H3N2) (OLALEYE et al., 1999). Neste estudo, níveis elevados de anticorpos contra o vírus humanos tipo A e B foram detectados em soros de eqüinos. Tal achado também foi observado em primatas não-humanos (HAGURI, 2000).

Mancini e colaboradores (2004) no intuito de investigar, a incidência do vírus influenza e seu ciclo de transmissão interespecíes, realizaram um levantamento sorológico em eqüinos, confrontando cepas específicas (eqüino) e não específicas (humana) deste vírus. Os resultados demonstraram que as respostas sorológicas dos eqüinos apresentaram reação cruzada entre as cepas específicas e as não específicas. As porcentagens de títulos obtidos pela Prova de Inibição da Hemaglutinação foram de 62,75% e de 60,65% para as cepas específicas A/Eq1 (H7N7) e A/Eq2 (H3N8), respectivamente. E para as cepas não específicas essas porcentagens foram de 79,05% para A (H1N1), de 94,45% para A (H3N2) e de 77,75% ao tipo B. O mais relevante nestes dados comparativos com vírus influenza foi à alta porcentagem de resposta protetora à cepa não específica comparada àquela específica. Considerando o fato de que o tipo B, deste vírus, é restrito à espécie humana, portanto a resposta de proteção nos eqüinos sugere uma

direta transmissão interespécies, como a observada nas viroses zoonóticas. Pela primeira vez esse tipo de evento é descrito no Brasil.

#### **2.10.4. Homem**

A influenza é uma importante causa de doença respiratória aguda, acomete pessoas de todas as faixas etárias. Nos adultos sadios a recuperação geralmente é rápida. Entretanto, complicações graves podem ocorrer entre idosos, crianças, portadores de doenças crônicas e imunodeprimidos, determinando elevados níveis de morbimortalidade. O vírus influenza, em períodos interpandêmicos é responsável por um bilhão de casos de infecção viral, resultando em 300.000-500.000 óbitos a cada ano (SVS, 2004)

Entre as doenças respiratórias que acometem humanos a influenza é a mais investigada, devido à sua grande transmissibilidade, potencial epidêmico e possibilidade de prevenção por meio de vacina (SVS, 2004).

A influenza humana está caracterizada por três subtipos de hemaglutinina imunologicamente distintos (H1, H2 e H3) e duas neuroaminidases (N1 e N2). Os subtipos H1 e H3 vêm sendo identificados com freqüência entre a população humana, por outro lado, Desde 1968, não há confirmação de influenza causada pelo subtipo H2 (SVS, 2005a).

No período de 2000 a 2005, foram coletadas 7.002 amostras de secreção nasofaringeana, e 1.428 (20,4%) foram positivas para síndrome gripal, das quais 557 (39%) foram positivas para influenza. Dessas 453 (81,3%) foram identificadas como Influenza A e 104 (18,7%) como Influenza B. Outros vírus identificados neste período foram: Vírus Sincicial Respiratório (29,3%), Adenovírus (17%) e Parainfluenza (16,3%) (SVS, 2005b).

No ano de 2002 foram detectados e investigados dois importantes surtos comunitários de influenza no país, nas cidades de Araraquara/SP e do extremo oeste de Santa Catarina, totalizando aproximadamente 3 mil casos confirmados (influenza B Hong Kong). Em 2003, novo surto comunitário foi detectado nas cidades de Pium e Araguacema/TO, com a confirmação de cerca de 500 casos (influenza A Tocantins H3N2) (SVS, 2005a).

Em 2004, até a semana epidemiológica (SE) nº 36 foram coletadas 1.168 amostras na rede sentinela, das quais 366 (31,3%) foram

positivas para vírus respiratórios pelo método da imunofluorescência. Destas, 152 foram positivas para influenza A, tendo sido possível fazer a caracterização antigênica inicial de 23 (15%) dessas amostras, assim identificadas: influenza A H3N2 (67%), influenza B (20%) e influenza A H1N1 (13%) (SVS, 2005a).

Foram notificados no Brasil, em 2004, onze surtos de síndrome gripal, distribuídos nas regiões Norte (Amazonas), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul). Nesses surtos, a média de pessoas acometidas foi de 22,4%, variando em comunidades fechadas de 3,5% em um abatedouro de aves a 48% em um asilo. As cepas identificadas nos surtos foram iguais às identificadas nas unidades sentinelas demonstrando a eficiência dessa ferramenta do sistema de vigilância (SVS, 2005b).

No primeiro e segundo trimestres de 2004 observou-se uma maior identificação e notificação de surtos de síndrome gripal no Brasil, quando comparado aos anos anteriores. Entre as hipóteses levantadas, incluem a introdução no Brasil da cepa FLU A/Fujian/411/02 em período anterior a campanha vacinal e à maior sensibilidade dos profissionais de saúde para a notificação de surtos dessa natureza. Isto é o resultado das ações de vigilância e controle da Influenza que vêm sendo desenvolvidas no País nos últimos anos, que passaram a dar maior visibilidade a esse importante problema de saúde pública (SVS, 2005b).

Em 2005, do total de atendimentos nas unidades sentinelas, 12,6% apresentaram síndrome gripal (160.099/1.267.868). Foram analisadas 1.927 amostras de secreção de nasofaringe com identificação para vírus respiratório em 297 (15,4%) amostras. Dessas, 107 (36%) foram positivas para influenza, das quais 94 (87,9%) influenza A e 13 (12,1%) influenza B. Outros vírus identificados neste período foram o vírus sincicial respiratório (28,3%), o adenovírus (15,3%) e o parainfluenza (17,0%). Nesse mesmo ano foram notificados 2 surtos de síndrome gripal, envolvendo o subtipo H3, um no Pará e outro em São Paulo (SVS, 2005b).

No ano de 2006 foram analisadas, pelo Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo/FIOCRUZ através da técnica de Multiplex RT-PCR, 152 amostras oriundas de pacientes com síndrome gripal para identificação de vírus respiratórios. Dessas, 41% e 20% foram positivas para o subtipo H3 e H1 do vírus influenza A, respectivamente, 18% foram identificadas como Influenza

B e 21% não se tratava de Influenzavirus. Durante o referido ano foi possível verificar a disseminação dos subtipos H3 e H1 em diversas regiões do Brasil: Alagoas (5%), Bahia (7%), Paraná (8%), Minas Gerais (9%), Rio de Janeiro (11%) e Rio Grande do Sul (60%) (SIQUEIRA, 2008).

Durante o ano de 2007 o Laboratório de Vírus Respiratório e Sarampo/FIOCRUZ testou pela técnica de RT-PCR 344 amostras clínicas, dessas 74 foram sequenciadas e o subtipo que circulou com maior intensidade foi H3N2 identificado em 53 (71%), seguido pelo subtipo H1N1 e 14% pertenciam ao Tipo B. As amostras eram oriundas de diversas regiões do Brasil e em todos os estados houve predominância do subtipo H3 conforme demonstra no quadro abaixo expresso em porcentagem (SIQUEIRA, 2008).

**Tabela 1.** Distribuição do vírus influenza em diferentes estados no ano de 2007 expresso em porcentagem (Siqueira, 2008)

	<b>H3</b>	<b>H1</b>	<b>TIPO B</b>	<b>NEGATIVO</b>
<b>RIO DE JANEIRO</b>	20	3	7	70
<b>MINAS GERAIS</b>	61	39	0	0
<b>BAHIA</b>	83	17	0	0
<b>PARANA</b>	78	22	0	0
<b>SANTA CATARINA</b>	71	29	0	0
<b>RIO GRANDE DOSUL</b>	83	9	7	1

No Brasil, os dados disponíveis no Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Influenza (Sivep-Gripe) demonstraram para o período 2000/2003, a ocorrência de casos de síndrome gripal predominantemente em crianças na faixa etária de 0-4 anos (48,2%), seguida

da faixa de 5-14 anos (25,4%) e de 15-24 anos (10,2%). As demais faixas contribuíram com 16,2% (SVS, 2005a).

Na ocorrência de surtos de gripe as complicações mais comuns envolvem os idosos, crianças e indivíduos debilitados. As situações sabidamente de risco incluem doença crônica pulmonar (asma e doença pulmonar obstrutiva crônica – DPOC), cardiopatias (insuficiência cardíaca crônica), doença metabólica crônica (diabetes, por exemplo), imunodeficiência ou imunodepressão, gravidez, doença crônica renal e hemoglobinopatias (SVS, 2005a).

Por essa razão, desde 1999, o Ministério da Saúde implantou a vacinação contra gripe no Brasil, com o objetivo de proteger os grupos de maior risco contra as complicações da influenza. É também recomendável a vacinação de profissionais de saúde que atuam na assistência individual de casos de infecção respiratória e de trabalhadores de asilos e creches, como forma de reduzir o potencial de transmissão da doença em comunidades fechadas e grupos mais vulneráveis à infecção. Outro grupo de risco são os trabalhadores de avicultura, cuja vacinação visa protegê-los contra infecção cruzada com vírus da influenza aviária (SVS, 2005a).

Em 2009 uma amostra recombinante (A/Califórnia/04/2009) do subtipo H1N1 desencadeou a mais recente pandemia de influenza, esta foi a primeira vez desde 1968 que a OMS declara um alerta de pandemia de gripe, o grande número de casos diagnosticados no mundo levou a OMS a elevar o nível de alerta do vírus H1N1 para fase 6 em menos de dois meses da data do primeiro caso, significando que já havia a disseminação da infecção entre humanos, no nível comunitário, em diferentes regiões (continentes) do mundo e as proporções só não foram maiores devido a baixa taxa de letalidade (WHO, 2009b; FAO, 2009).

Estudos antigênicos e genômicos identificaram a amostra de 2009 (A/Califórnia/04/2009) como uma recombinação de quatro diferentes estirpes de vírus influenza, duas de origem suína que não havia sido detectada previamente em humanos ou suínos (WHO, 2009b; FAO, 2009).

No Brasil, Até a semana epidemiológica 47, foram confirmados 30.055 casos de SRAG (Síndrome Respiratória Aguda) por algum vírus influenza, sendo que a proporção de influenza pandêmica foi de 93% (27.850/30.055) e de influenza sazonal de apenas 7% (2.205/30.055). Padrão

similar ao observado pela Rede Global de Vigilância da Influenza da OMS, que registrou 93% de influenza pandêmica entre todos os vírus de influenza monitorados no mundo, evidenciando a substituição das amostras sazonais pela pandêmica (SVS, 2010a).

### a) Influenza Pandêmica (H1N1) 2009

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), do início da pandemia ao final do ano epidemiológico de 2009, em 2 de janeiro de 2010, houve notificação de circulação do vírus pandêmico em 208 países, territórios ou comunidades. Sendo que no final do ano de 2009, as áreas com maior atividade na transmissão eram o centro, o oeste e o sudeste da Europa, norte da África e sul da Ásia. Em 2009, foram notificados 12.799 óbitos confirmados laboratorialmente (Tabela 2). A partir dos últimos meses de 2009, a OMS passou a consolidar os dados epidemiológicos somente dos óbitos, de acordo com as regiões administrativas do órgão (SVS, 2010a).

**Tabela 2.** Taxa de mortalidade e distribuição do total de óbitos confirmados laboratorialmente por região administrativa da OMS em 2009.

Regiões da OMS	N de países	População (milhões)	Taxa de mortalidade (10.000 hab.)	Óbitos*
América	35	894.944	76,9	6.880 (53,8%)
Europa	53	887.456	28,8	2.554 (20%)
Sudeste asiático	11	1.721.048	6,8	1.165 (9,1%)
Pacífico ocidental	27	1.763.400	7,7	1.361 (10,6%)
Mediterrâneo oriental	21	540.283	13,1	708 (5,5)
África	46	773.792	1,7	131 (1,0%)
Mundo	193	6.580.923	19,4	12.799 (100%)

Segundo a Rede Mundial de Vigilância da Influenza (RMVI), ao final de 2009 o vírus influenza A predominante no mundo é o da influenza pandêmica (H1N1) 2009, encontrado em até 99% dos resultados laboratoriais

em alguns países do hemisfério norte e sul. Desde o início da pandemia, em 19 de abril de 2009, a 2 de janeiro de 2010, a RMVI recebeu material biológico de 153 países/áreas/territórios, representando um total de 23.335 amostras (18.171 amostras clínicas e 5.164 vírus isolados). Destas, 15.944 espécimes (amostras clínicas e isolados) foram testadas, 12.876 (80,8%) foram positivas para o vírus da influenza, sendo que 8.628 (67%) foram positivas para influenza pandêmica (H1N1) 2009, 3.385 (26,3%) para influenza sazonal A e 848 (6,6%) eram influenza B sazonal (SVS, 2010a).

No Brasil, a pandemia foi dividida em duas fases epidemiológicas e operacionais distintas, são elas: Fase de contenção e mitigação.

**1. Fase de contenção:** Período em que o vírus estava se disseminando no mundo e os casos estavam relacionados às viagens internacionais ou contato com pessoas doentes que tinham realizado viagens internacionais.

Nesta fase foram registrados 12.919 casos suspeitos de síndrome gripal (SG) e síndrome respiratória aguda grave (SRAG). A região com maior frequência de casos notificados foi a região sudeste, com 54,2% (7.004/12.919), seguida da região Sul, com 36,5% (4.712/12.919)(SVS, 2010a)

Desde a declaração de pandemia pela OMS, somente entre a semana epidemiológica 23 e 24 observou-se um aumento expressivo (79%) do número de casos confirmados, passando de 94 para 441 casos confirmados. Do total de casos dessas duas semanas, 59% (315/535) relataram viagem ao exterior e os demais eram contatos próximos desses viajantes. Entretanto, entre a Semana epidemiológica 27 e 28, esta característica deixa de ser observada, pois apenas 5% (107/2.288) passaram a apresentar histórico de viagem ao exterior. Entre este mesmo período observamos um aumento significativo (51%) no número de casos confirmados, subindo de 748 para 1.540. Esta evidência corroborava com os achados obtidos de investigações epidemiológicas. A partir de um conjunto de evidências, o Ministério da Saúde declarou a transmissão sustentada em todo o território nacional no dia 16 de julho de 2009 (SVS, 2010a).

**2. Fase de mitigação:** É a fase atual e compreende o período pós-declaração de transmissão sustentada do vírus da influenza pandêmica em todo o território nacional. As ações recomendadas para esta fase visam reduzir a gravidade e

mortalidade pela doença, por meio do diagnóstico e tratamento dos casos que apresentam risco para doença grave ou óbito, ou que apresentam algum sinal de agravamento (SVS, 2010a).

Na fase de mitigação, visando atenuar a ocorrência de casos graves e óbitos pela doença, adotou-se o monitoramento de casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) definidos por febre, tosse e dificuldade respiratória, independentemente da história de viagem internacional, além dos óbitos. Nesta fase o sistema buscava tornar-se mais específico na identificação e monitoramento dos casos, uma vez que o vírus já se encontrava disseminado e não era passível de controle (SVS, 2010a).

Nessa fase houve um predomínio de casos na região Sul do país, representando 55,7% (48.531/87.171) dos registros; seguido da região Sudeste, com 35,6% (31.048/87.171). Ao final do inverno, observou-se uma tendência de redução de casos nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. No entanto, na região Norte e Nordeste observou-se um aumento na frequência de casos (SVS, 2010a) .

A pandemia causada pelo vírus influenza pandêmica (H1N1) 2009, associada à sua virulência, constitui-se em grande desafio para a saúde pública e nesse sentido os países membros da Organização Mundial de Saúde e da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) acordaram a realização da vacinação, não para conter a epidemia, mas para preparar os países para enfrentar a segunda onda da pandemia (SVS, 2010b).

Segundo a OMS (2009), aproximadamente 40 países começaram campanhas nacionais de vacinação contra a gripe pandêmica (H1N1) de setembro até meados de novembro de 2009. A partir de informações encaminhadas por 16 países, a OMS estima que foram distribuídas cerca de 80 milhões de doses de vacinas e vacinadas em torno de 65 milhões de pessoas. No Brasil, O Ministério da Saúde adquiriu dos laboratórios Glaxo SmithKline (GSK), Sanofi Pasteur/Butantan e Novartis, um total de 112,9 milhões de doses da vacina monovalente influenza pandêmica (H1N1) 2009, sendo 68 milhões de doses sem adjuvante e 44,9 milhões de doses com adjuvante, totalizando um investimento de mais de 1 bilhão (SVS, 2010b).

Em Janeiro de 2010, o Ministro da Saúde anunciou a estratégia nacional de imunização contra o vírus influenza pandêmico (H1N1). Um dos principais pilares dessa estratégia é a vacinação dos grupos prioritários,

realizada em cinco etapas em todas as Unidades Federadas. O objetivo da ação não é evitar a disseminação do vírus, que já está presente no Brasil e em 209 países, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mas manter os serviços de saúde funcionando e reduzir o número de casos graves e óbitos. A expectativa é imunizar pelo menos 62 milhões de pessoas contra a gripe pandêmica (SVS, 2010c; 2010d).

Além da implantação da política de vacinação outras medidas de mitigação estão sendo implementadas para um maior controle de influenza pandêmica (H1N1) 2009 e de sua possível segunda onda, esperada para o ano de 2010. Segundo os dados do SINAN, a partir da base de dados obtidos em 06 de abril de 2010, no período que compreende as semanas epidemiológicas 01 a 13 de 2010 (03/01 a 03/04/2010), foram notificados 2.509 casos. Deste total, 14,4% (361/2.509) foram confirmados para influenza pandêmica no Brasil, conforme classificação. A região sudeste apresenta a maior proporção de casos notificados 42,8% (1.074/2.509), entretanto a região norte apresenta a maior proporção de casos confirmados 56,2% (203/361) (SVS, 2010e)

### **3. INFLUENZA CANINA**

Durante a década de 70 foram observadas infecções experimentais e naturais em cães pelo vírus da influenza humano, no entanto não se conseguiu evidenciar o papel dos cães na cadeia epidemiológica do vírus influenza. Nikitin, Cohen & Todd (1972) infectaram experimentalmente cães com amostra humana (A / Hong Kong/68) do vírus influenza, apesar de não terem desenvolvido a doença, os cães demonstraram susceptibilidade a variante (A / Hong Kong/68). Posteriormente Kilbourne & Kehoe (1975) realizaram pesquisa sorológica em 79 cães e observaram que 6 desses animais apresentaram anticorpos frente ao subtipo H3N2 de origem humana.

O primeiro relato de infecção natural e fatal em cães pelo subtipo H5N1 ocorreu após a ingestão de um pato infectado durante um surto de gripe aviária na Tailândia (2004). Os sintomas de febre alta e letargia surgiram 5 dias após a ingestão da ave e culminou com a morte do animal. Os achados de necropsia incluíam descarga nasal, congestão e edema pulmonar grave além de congestão do baço, rim e fígado. O diagnóstico virológico permitiu identificar

o subtipo H5N1 (A/Dog/Thailand/KU-08/04) como o agente responsável pela infecção do cão (SONGSERM et al., 2006).

Após o episódio de 2004 que cursou com a infecção do referido canino pelo subtipo aviário, pesquisadores iniciaram estudos sobre a infectividade do subtipo H5N1 em cães. Na ocasião, foram realizadas inoculações intranasais e intratraqueais do antígeno (H5N1) em cães SPF, que eram monitorados clinicamente e tinham suas excreções coletadas diariamente na tentativa de realização do isolamento viral. Através da identificação do antígeno conjugado ao isocianato de fluoresceína nos epitélios coletados foi possível verificar que receptores para o H5N1 estão presentes na porção inferior do trato respiratório, na mucosa nasal e traqueal dos cães, funcionando como potenciais portas de entrada para esse agente (MAAS et al., 2007).

Durante o mesmo surto de influenza aviária (H5N1) na Ásia em 2004 houve relato da infecção fatal de gatos por esse subtipo viral. Nessa ocasião pesquisadores infectaram gatos com o subtipo H5N1 pela via intratraqueal e através da ingestão de aves sabidamente infectadas e verificaram que os animais infectados desenvolveram a doença e foram capazes de excretar partículas virais, ressaltando a possibilidade da transmissão horizontal e o importante papel dos felinos na cadeia epidemiológica dessa virose (KUIKEN et al., 2004).

Após a confirmação da transmissão do vírus influenza altamente patogênico de aves para um cão na Tailândia, Amonsin e colaboradores (2007) realizaram análises genômicas e filogenéticas dos genes que codificam as glicoproteínas H e N e verificaram que a amostra canina (A/Dog/Thailand/KU-08/04) estava estreitamente relacionada com o subtipo viral isolado de tigres, galinhas, patos, e seres humanos infectados na Tailândia durante surtos de influenza ocorridos nos anos de 2004 e 2005. Na ocasião, destacaram a possibilidade de transmissão do subtipo H5N1 canino para os humanos através do contato direto com esses animais e ressaltou a necessidade de monitoramento dos animais domésticos durante futuros surtos de influenza pelo subtipo H5N1.

Infecções experimentais com o vírus influenza (H5N1) foram realizadas em cães e gatos. Na ocasião esses animais foram infectados pela via oculo-nasofaríngea e mantidos em contato com cães e gatos saudáveis e sorologicamente negativos para o subtipo H5N1. Esses animais foram

monitorados através de exames clínicos e amostras foram coletadas periodicamente para o isolamento viral. Sinais como febre e conjutivite foram observados a partir do segundo dia pós-infecção nos cães, por outro lado os felinos desenvolveram sintomas mais intensos como: febre alta, letargia, conjutivite e dificuldade respiratória sugerindo que esses animais sejam mais susceptíveis do que os cães a doença. Na oportunidade, foi possível realizar o isolamento viral a partir das amostras colhidas dos cães e gatos inoculados pelo vírus H5N1, no entanto não ficou demonstrada a capacidade de transmissão interespecie (GIESE et al., 2008).

Giese e colaboradores (2008) destacaram que apesar dos cães terem desenvolvido uma doença respiratória branda deve-se considerar o importante papel desses animais no processo de adaptação do subtipo aviário altamente patogênico aos mamíferos domésticos e sua consequente transmissão ao homem.

No intuito de esclarecer a importância dos canídeos e felídeos na cadeia epidemiológica do vírus influenza estudos envolvendo esses animais estão sendo realizados em diversos países do mundo. Cleaveland e colaboradores (2006) realizaram na Tailândia o primeiro estudo de prevalência do vírus influenza subtipo H5N1 em cães e gatos, observando prevalência de 160 (25,4%) e 111 (7,2%) respectivamente. Esses resultados sugerem que o subtipo H5N1 encontra-se disseminado entre a população de cães e gatos, reforçando a hipótese de que essas espécies podem exercer papel importante como sentinelas, funcionando como ferramenta valiosa para a vigilância dos subtipos altamente patogênicos do vírus influenza e na determinação de padrões espaciais e temporais que impeçam a rápida difusão desse agente à população humana susceptível.

Apesar da existência de vários relatos de infecção em cães pelo vírus da influenza aviária de alta patogenicidade (H5N1) esse subtipo não pode ser considerado como vírus da gripe canina, uma vez que não foi estabelecida a transmissão horizontal do agente entre os caninos (CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2009)

Em 2004, o isolamento de um vírus influenza em cães de corrida da raça Galgos mudou o foco das discussões sobre o vírus da gripe na espécie canina. O subtipo em questão não era originário de aves ou humanos, tratava-se de uma estirpe que acometia exclusivamente eqüídeos, rompeu a barreira

interespécie e passou a infectar cães, estabelecendo pela primeira vez a transmissão horizontal entre os cães e passou a ser conhecido como o vírus da influenza canina (CRAWFORD et al., 2005).

Em janeiro de 2004 um surto de doença respiratória acometeu 22 cães de corrida, da raça galgo. Duas síndromes clínicas foram observadas, 14 animais apresentaram sintomas brandos como febre e tosse e se recuperaram após 10 a 14 dias do início dos sintomas e outros 8 animais desenvolveram doença aguda e fatal associada à hemorragia do trato respiratório. Análises de amostras pulmonares e resultados de soro conversão permitiram concluir que um novo subtipo do vírus influenza A/canine/Florida/43/2004 (canine/FL/04), era o responsável pelo surto de gripe que acometeu vários cães da raça galgo, na Flórida (CRAWFORD et al., 2005).

Análises antigênicas e genômicas apontaram homologia de 96% entre a cepa isolada e a amostra do vírus circulante da influenza equina, subtipo H3N8 e que não houve recombinação genética com outros subtipos virais, o genoma completo do vírus eqüino foi transmitido aos cães. As análises identificaram quatro diferenças de aminoácidos entre a hemaglutinina dos eqüinos e vírus canino, estas alterações foram, provavelmente, importantes na adaptação do vírus aos cães (CRAWFORD et al., 2005).

Estudo complementar foi realizado, 3 meses após a ocorrência do surto de influenza canina, com animais doentes e assintomáticos que moravam na mesma residência daqueles que desenvolveram a doença. Os resultados demonstraram que do total de 73 cães analisados, 85% e 95% dos cães doentes e dos contactantes sadios, respectivamente, reagiram positivamente frente o subtipo H3N8 e destacam que a infecção pelo vírus da influenza canina pode ocorrer na forma subclínica, se difundir rapidamente e afetar uma população susceptível, com conseqüências desastrosas (CRAWFORD et al., 2005).

Episódios de manifestações respiratórias foram descritos em anos anteriores em cães de corrida, nos Estados Unidos, no entanto na ocasião não havia sido possível a identificação do agente. Após o isolamento do vírus influenza eqüina em cães (A/canine/Florida/43/2004) pesquisadores iniciaram um trabalho de reavaliação das amostras armazenadas de surtos anteriores a janeiro de 2004. Exame para detecção viral foi realizado em tecido pulmonar de um cão que morreu em março 2003 com broncopneumonia hemorrágica e

permitiu o isolamento de outro vírus influenza A/canine/Florida/242/2003 (canine/FI/03). Estudos filogenéticos identificaram homologia de 99% com a amostra A/canine/Florida/43/2004, além disso, soros da mesma época apresentaram reatividade para o subtipo H3N8. Esses achados permitiram concluir que o vírus da influenza canina circulava entre a população de cães de corrida, antes de sua primeira detecção, em 2004 (CRAWFORD et al., 2005).

A identificação do vírus da influenza canina como causador do surto de doença respiratória na Flórida (2004) estimulou Daly e colaboradores (2008) a realizarem um estudo retrospectivo utilizando amostras coletadas durante um surto de doença respiratória que acometeu cães da raça foxhound, em Setembro de 2002, no Reino Unido. Os resultados revelaram que o surto de 2002 foi causado pelo subtipo eqüino (H3N8) e que o tecido respiratório canino possui receptores importantes que permitem a infecção pelo vírus da influenza eqüina.

A doença foi caracterizada pelo aparecimento rápido de febre e tosse, respiração rápida, e corrimento nasal hemorrágica. O Departamento de Agricultura E.U. Nacional de Serviços Veterinários (Laboratório Ames, IA) identificou a amostra isolada como pertencente ao subtipo H3N8 (A/Canine/Iowa/13628/2005). Filogeneticamente, os genes que codificam a glicoproteína H (GenBank DQ146419) e NA (DQ146420) apresentam 96% e 98% de homologia com o subtipo eqüino H3N8 (YOON et al., 2005).

Yoon e colaboradores (2005) ressaltaram que no episódio de gripe canina ocorrido em Iowa e na Flórida, em 2004, não houve a participação dos eqüinos na cadeia de transmissão, sugerindo que a amostra A/Canine/Iowa/13628/2005 pertencente a linhagem canina, encontrava-se adaptada sendo capaz de disseminar entre os cães.

Embora a identificação do vírus da influenza em cães de corrida tenha sido uma descoberta significativa, o foco de investigação rapidamente voltou-se para outros representantes da população canina. Dados sorológicos de amostras coletadas em abrigos e clínicas de animais na Flórida e Nova Iorque demonstraram a presença do vírus influenza na população de animais de estimação (CRAWFORD et al., 2005). O isolamento do vírus influenza em cães de estimação na Flórida e Nova Iorque, em 2005, foi a evidência de que as infecções por este vírus não se restringiram aos cães de corrida, animais geralmente estressados, mantidos em aglomerações e que todas as raças de

cães são susceptíveis ao vírus da influenza canina (PAYUNGPORN et al., 2008)

Durante o outono de 2005, foram descritos surtos em 11 estados americanos (Florida, Texas, Arkansas, Arizona, Virginia, Kansas, Iowa, Colorado, Rhode Island, Wisconsin e Massachusetts) na ocasião foi observado 50% de soroconversão e 100% de soropositividade entre os animais testados frente a amostra A/canine/Florida/43/2004. Durante o mesmo período foi realizado um inquérito sorológico, com cães que apresentavam sintomas compatíveis com os da influenza. As 5.000 amostras coletadas, em vários estados norteamericanos, foram analisadas pelo Centro de Saúde Animal Diagnostic Center, na Universidade de Cornell, Nova York que evidenciou claramente a presença do vírus da influenza canina, na Flórida, na cidade de Nova Iorque, New Jersey, Arizona e na Califórnia naquele momento (CRAWFORD et al., 2005).

Durante o mês de abril de 2005 um surto de doença respiratória acometeu cães alojados em um abrigo no nordeste da Florida. O surto envolveu pelo menos 58 cães, na faixa etária de 3 meses a 9 anos, incluindo animais de raças puras e mestiças (CRAWFORD et al., 2005). Em maio de 2005, foi descrito outro surto de doença respiratória que acometeu aproximadamente 40 cães em uma clínica veterinária no sudeste da Flórida.

As amostras isoladas nos dois surtos, A/canine/Jacksonville/2005 e A/canine/Miami/2005, foram identificadas como representantes do subtipo H3N8 e após análise antigênica e genômica foi comprovada a homologia de 98% do gene que codifica a glicoproteína H3 das amostras A/canine/Florida/242/2003, A/canine/Florida/43/2004, A/canine/Texas/2004 e A/canine/Iowa/2005 isoladas de cães de corrida que foram à óbito por pneumonia durante os surtos de influenza ocorridos em 2004 e 2005, demonstrando que a influenza canina não está restrita aos cães de corrida (PAYUNGPORN et al., 2008). A ocorrência de infecção de cães de estimação pelo vírus da influenza, o principal animal de companhia dos seres humanos, aumenta a possibilidade de que os cães possam desempenhar uma nova fonte para a transmissão dos vírus da gripe A aos seres humanos (CRAWFORD et al., 2005, PAYUNGPORN et al., 2008).

Em janeiro de 2006, resultado de pesquisa sorológica indicava a presença do vírus da influenza canina na região Colorado e em dezembro do

mesmo ano foi descrito um surto de gripe em canis e abrigos de Denver, Colorado. Tal fato reforçou a importância do monitoramento e da vigilância dessa virose a fim de recomendar oportunamente, sobre bases firmes, as medidas indicadas e eficientes que levem à prevenção dos possíveis surtos da doença. Resultados positivos de soroconversões foram registrados em Utah, em agosto de 2006, presumivelmente como um desdobramento da epizootia no Colorado (DUBOVI & NJAA, 2008).

Vários surtos de influenza foram registrados, tal como em Kentucky (setembro 2006), Pensilvânia (Janeiro 2007), o leste da Pensilvânia (julho 2007) e Los Angeles, Califórnia (Julho 2007). O transporte de animais, sem o devido controle são fatores determinantes na disseminação da Influenza canina, por essa razão a epidemiologia dessa virose está diretamente relacionada com o regime em que são criados os cães, um exemplo claro, foi o caso de um cão infectado residente na cidade de Nova Iorque que havia sido transportado para Ithaca e contaminou vários animais (DUBOVI & NJAA, 2008).

Os casos de gripe canina não ficaram limitados aos Estados Unidos. Surto de doença respiratória aguda em cães da raça quarry hounds foi descrito no Reino Unido em 2002 e posteriormente identificado como sendo causado pelo vírus da gripe canina (SMITH et al., 2005). Estudo de soroprevalência identificou anticorpos para o vírus da influenza eqüina (H3N8) em 37,5% dos cães da raça foxhounds, no entanto, a soroprevalência foi de 0% em cães nascidos após 1 de abril de 2003 e 90% em cães nascidos antes 1 de novembro de 2002. Curiosamente, o período de maior prevalência nos caninos coincidiu com o momento em que o vírus da gripe H3N8 foi circulante na população eqüina da Inglaterra (NEWTON, COOKE & ELTON, 2007).

Um estudo transversal utilizando uma amostragem de conveniência foi realizado em cães atendidos em 9 clínicas veterinárias em Ontário. As clínicas estavam localizadas nas regiões da Aurora, Barrie, Kitchener-Waterloo, Niagara Falls, Ottawa, Thunder Bay, Toronto e Windsor. Foram coletadas amostras de 225 cães e observada a presença de anticorpos contra o vírus da gripe canina em apenas 1 (0,4%) animal da população testada. O animal soropositivo era um cão da raça galgo, sem histórico de doença respiratória e oriundo, de um centro de corrida para cães, na Flórida (KRUTH, CARMAN & WEESE, 2008).

No final de 2007, um surto de influenza acometeu diversos eqüinos na Austrália, durante o episódio foram observados casos de doença respiratória em cães de diferentes idades e raças que mantinham contato com os eqüinos infectados ou com seus tratadores. Foram coletadas amostras de cães, oriundos de 5 regiões localizadas aproximadamente 20-60 Km do foco primário. Dos 40 animais examinados, 10 apresentavam sintomas respiratórios compatíveis com influenza (anorexia, letargia, tosse e secreção nasal) e 23 apresentaram soropositividade frente o subtipo eqüino (*A/equine/Sydney/2007*). Os resultados demonstraram que todos os cães soropositivos encontravam-se nas proximidades dos eqüinos infectados, mas nem sempre em contato direto e que não há evidências de transmissão horizontal entre os cães infectados. Análises antigênicas das amostras isoladas de cães e eqüinos revelaram homologia com a amostra isolada em 2007 durante surto de gripe eqüina no Japão e apresentaram divergência antigênica com as amostras isoladas nos Estados Unidos, reforçando a hipótese de que o vírus da influenza canina evoluiu em duas linhagens (KIRKLAND et al., 2010).

Em abril de 2008, cães soropositivos foram identificados em 25 estados americanos e no distrito de Columbia (PAYUNGORN et al., 2008)

A influenza tem sido diagnosticada em variedade de raças de animais em clínicas veterinárias e abrigos em várias regiões dos Estados Unidos, despertando a atenção das autoridades sanitárias na América do Norte que temem a infecção e difusão entre humanos devido à capacidade adaptativa desse agente, ao estreito contato do homem com os cães (CRAWFORD et al., 2005) e o potencial zoonótico demonstrado pelo subtipo H3N8 (KASEL et al., 1965 apud MOIRIGNOT, 1977; ALEXANDER & BROWN, 2000; MANCINI et al., 2004).

Entre maio e setembro de 2007, na Coreia do Sul, três vírus (*A/canine/Korea/01/2007*; *A/canine/Korea/02/2007* e *A/canine/Korea/03/2007*) foram isolados de cães apresentando doença respiratória grave. Análises demonstraram que as amostras isoladas eram geneticamente semelhantes ao subtipo (H3N2) de origem aviária (SONG et al., 2008).

Song e colaboradores (2009) no intuito de verificar a possibilidade de transmissão horizontal do novo vírus da gripe canina (H3N2) infectaram experimentalmente cães da raça beagle com o subtipo H3N2 e mantiveram esses animais em contato direto com outros sabidamente sadios. . Após alguns

dias tanto os cães infectados quanto os contactantes apresentavam sintomas como febre, descarga nasal, espirro e tosse. Na oportunidade foi realizado o isolamento viral nos dois grupos de cães, infectados e não infectados. Os resultados do presente estudo demonstraram que o vírus de origem aviária (H3N2) isolado em cães domésticos pode ser transmitido de cão a cão através do contato direto.

Apesar dos indícios, ainda não foi possível identificar a transmissão do vírus da influenza canina aos humanos, alguns pesquisadores destacam que a possibilidade de transmissão é rara devido a restrições impostas pelas células do epitélio traqueal humano que contêm N-acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,6-galactose e não acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,3-galactos. No entanto, a ausência de receptores específicos não representa uma barreira à transmissão interespecie, como evidenciado pela recente infecção de humanos pelo subtipo aviário H5N1 que tem predileção por receptores do tipo acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,3-galactos e infectou humanos em diversas partes do mundo (JANET, 2006).

### **3.1. Distribuição Geográfica**

O vírus da gripe canina, H3N8, tem sido descrito em várias regiões dos Estados Unidos. Entre 2004-2006, as infecções ocorreram em cães da raça galgos, em vários estados, incluindo: Florida, Texas, Arkansas, Alabama, Arizona, West Virginia, Kansas, Iowa, Colorado, Rhode Island e Massachusetts. As infecções de cães de estimação foram relatadas primeiramente na Flórida e se espalharam para outras áreas, incluindo Colorado, Flórida e New York City (New York, New Jersey e Connecticut). O subtipo H3N2 foi identificado apenas na Korea (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGORN et al., 2008; SONG et al., 2008).

### **3.2. Transmissão**

Nos mamíferos, os vírus da gripe são geralmente transmitidos por aerossóis através de tosse e espirros, e pelo contato com descargas nasais e fômites contaminados, o contato direto, ambientes com aglomerações e fechados favorecem a transmissão. A Transmissão do vírus da influenza,

subtipo H3N8 e H3N2 entre os caninos parece ocorrer de forma semelhante. Ambos os subtipos foram isolados de secreções respiratórias e nunca encontrados em fezes (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008; SONG et al., 2009).

A transmissão do subtipo H3N8 ocorreu de 7 a 10 após o início dos sinais clínicos e aproximadamente 20-25% dos cães permaneceram assintomáticos. Os cães experimentalmente infectados pelo subtipo H3N2 apresentaram esse vírus em secreções nasais a partir do segundo ao sexto dia após a inoculação (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008; SONG et al., 2009).

### **3.3. Período de incubação**

O período de incubação da infecção pelo subtipo H3N8 é de geralmente 2 a 5 dias, mas na maioria dos casos ocorre de 2 a 3 dias. Cães inoculados experimentalmente com o subtipo H3N2 apresentaram febre nas primeiras 24 horas e os outros sinais clínicos tiveram início 2 a 8 dias após a inoculação e aqueles que ficaram doentes após a exposição com os animais inoculados, com o subtipo H3N2, desenvolveram febre em 3 dias e outros sinais clínicos após 5 a 8 dias (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008; SONG et al., 2009).

### **3.4. Sintomatologia**

O início da sintomatologia ocorre 2 a 3 dias após a infecção, sinais como febre, anorexia, letargia e descarga nasal são comuns a todos infectados e os primeiros a serem observados. A secreção nasal evolui rapidamente de serosa a mucopurulenta. Pneumonias, devido a infecções bacterianas secundárias, podem ocorrer, agravando o quadro (DUBOVI & NJAA, 2008)

Na forma suave se caracterizam por febre, conjuntivite, tosse persistente e descarga nasal purulenta. Os animais severamente afetados exibem febre elevada, dificuldade respiratória, infecção bacteriana secundária e pneumonia. Felizmente, a forma mais grave da doença (pneumonia hemorrágica), como observada nos cães da raça galgos, na Flórida, não foi

observada na população de animais de estimação (CRAWFORD et al. 2005; YOON et al. 2005; SONGSERM et al., 2006; GIESE et al. 2008; PAYUNGPORN et al., 2008).

Quadros graves de pneumonia hemorrágica observados em cães da raça Galgos, em um surto na cidade de Iowa, complicaram como consequência de infecções bacterianas secundárias, associadas com *Streptococcus equi* subsp. *Zooepidemicus* (YOON et al. 2005).

Embora o vírus influenza seja o principal responsável pelos surtos de doença respiratória, a contribuição da infecção bacteriana secundária principalmente por *S. zooepidemicus*, *Staphylococcus spp*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pasteurella multocida*, e *Mycoplasma spp.* à gravidade do quadro clínico deve ser considerada (CRAWFORD et al., 2005; PAYUNGPORN et al., 2008).

As mortes ocorrem principalmente em cães com a forma grave da doença, a taxa de mortalidade é estimada de 1-5% ou ligeiramente superior. Durante episódios de surto da doença as taxas de letalidade têm sido maiores (CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2009)

As infecções pelo subtipo H3N2 foram caracterizadas pelo desenvolvimento de doença respiratória grave, com febre, corrimento nasal, espirros, tosse e anorexia. Quatro dos cinco cães atendidos em clínicas veterinárias morreram. Febre, espirros, tosse e descarga nasal ocorreram em cães experimentalmente inoculados e alterações patológicas graves foram observadas nos pulmões (SONG et al., 2008; SONG et al., 2009).

Analisando os sintomas e achados apresentados pelos cães infectados podemos verificar que as características clínicas desta enfermidade não são específicas e se assemelham àquelas causadas por outros agentes que acometem os cães e cursam sob a forma de surtos respiratórios, tais como: Pneumonias bacterianas, Parainfluenza (Parainfluenza canina), Complexo da tosse dos canis (*Bordetella bronchiseptica*, Vírus da Parainfluenza canina, Adenovírus canino do tipo 1 e 2, Herpesvírus canino, Reovírus canino do tipo 1, 2 e 3, Micoplasmas e Ureaplasmas, Cinomose (Paramyxovírus), Erlichiose (*Ehrlichia canis*) e outras. Essas características dificultam o diagnóstico da influenza canina apenas pela clínica e impossibilita a identificação e descrição da doença em cães (FORD & VADEN, 1990).

### 3.5. Achados Anatomo-patológicos

Os achados macroscópicos revelaram extensas áreas pulmonares com coloração vermelha a vermelho-escura e pleurite fibrinosa. Na microscopia observou-se severa broncopneumonia intersticial hemorrágica e atelectasia, e áreas de broncopneumonia piogranulomatosa com dilatação das vias aéreas, discreta vasculite e trombos vasculares (YOON et al., 2005).

Nos casos fatais hemorragias podem ser encontradas nos pulmões, mediastino e cavidade pleural, os pulmões exibem severa pneumonia intersticial, pleurite fibrinosa, traqueíte e bronquite, além de congestão do baço, rim e fígado. Foi evidenciada presença de necrose focal no fígado e nefrite leve com degeneração tubular (CRAWFORD et al., 2005; YOON et al., 2005; SONGSERM et al., 2006; GIESE et al., 2008; PAYUNGPORN et al., 2008).

Achados microscópicos revelam alterações nos septos alveolares que geralmente estão espessados por causa de edema e infiltração de células inflamatórias, com ou sem hemorragia dependendo da gravidade da síndrome. Alterações alveolares variam conforme as áreas localizadas de atelectasia e apresentam agregados de restos celulares e infiltração de neutrófilos e macrófagos (YOON et al., 2005; CRAWFORD et al., 2005).

Na síndrome hemorrágica grave, observa-se uma grande quantidade de exsudato hemorrágico dentro do interstício para além das vias aéreas e lúmen alveolar, além de vasculite e trombo intravascular. A traquéia, brônquios e bronquíolos são igualmente afetados com a perda de células epiteliais ciliadas, presença de infiltrado de células inflamatórias na camada submucosa, que variam de neutrófilos, linfócitos e macrófagos (CRAWFORD et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008).

Cães infectados experimentalmente com amostras do vírus da influenza canina A/canine/Florida/43/2004 desenvolveram traqueíte hiperplásica e necrosante, bronquite com comprometimento das glândulas da submucosa, assim como, metaplasia do epitélio traqueobrônquio, bronqueolite e alveolite multilobular severa e bronquiopneumonia supurativa (CASTLEMAN et al., 2010).

Em cães, que foram inoculados com o subtipo H3N2, foram encontradas consolidações multifocais avermelhadas coalescentes nos pulmões. As lesões histopatológicas incluíram severa ou difusa

traqueobronquite necrosante multilobular e grave bronquiolite e alveolite multilobular, além de leve a moderado espessamento do septo alveolar. Não foram observadas lesões fora do trato respiratório (SONG et al., 2008, SONG et al., 2009).

### **3.6. Morbidade e mortalidade**

Nos mamíferos, a gravidade da infecção pelo vírus influenza está diretamente relacionada com o subtipo viral, patogenicidade e a imunidade do hospedeiro. Na maioria das espécies, as infecções estão associadas às altas taxas de morbidade, baixas taxas de mortalidade e rápida recuperação. Doença mais grave e altas taxas de mortalidade estão associadas a infecção de animais jovens, idosos ou debilitados. Infecções bacterianas secundárias podem agravar os sintomas da gripe, prolongar a recuperação e resultar em complicações como a pneumonia (CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH, 2009)

A influenza canina causada pelo subtipo H3N8 foi primeiramente relatada em cães da raça galgo e, num primeiro momento, parecia estar restrita a esta raça. Investigações soroepidemiológicas identificaram 44% de positividade nos cães da raça galgo durante os anos de 2000-2004. Posteriormente o subtipo H3N8 foi identificado em outras raças de cães em clínicas veterinárias e abrigos (CRAWFORD et al., 2005).

A influenza canina é uma doença emergente, os cães não tinham sido expostos ao vírus canino, antes, a maioria da população encontra-se vulnerável a infecção. Muitos casos de influenza têm sido associados a clínicas, canis, alojamentos e outras áreas onde os cães estão aglomerados e em estreito contato. Nestes locais, a taxa de infecção pode chegar a 100% e os sinais clínicos geralmente ocorrem em 60-80% dos cães infectados. A maioria dos cães desenvolveu a forma branda da doença e logo se recuperam, no entanto, uma forma mais grave ocorre em uma minoria, principalmente cães jovens, idosos e debilitados (DUBOVI & NJAA, 2008).

As mortes geralmente ocorrem em cães com doença grave, geralmente a taxa de mortalidade é de aproximadamente 1-5%, podendo alcançar 8%. Durante surtos da doença foram observadas taxas de mortalidade

elevadas, como ocorreu em 2004, na Flórida, quanto 36% dos cães da raça galgo morreram (CRAWFORD et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008).

O vírus H3N2 foi relatado somente a partir de um surto em três hospitais veterinários e um canil na Coreia do Sul. Os casos foram descritos em um schnauzer miniatura, um cocker spaniel, um Yorkshire terrier e dois cães Jindo (uma raça de caça-coreana), bem como em 13 cães de raça mantidos em um abrigo de animais. Nesse episódio a doença parece ter sido grave, apenas um dos cinco cães atendidos em clínicas veterinárias sobreviveu (SONG et al., 2008; SONG et al., 2009).

### **3.7. Diagnóstico**

Existem várias técnicas laboratoriais disponíveis para o diagnóstico dos vírus influenza. Algumas dessas técnicas detectam diretamente a presença de antígenos virais ou ácidos nucléicos em amostras clínicas, células infectadas ou partículas virais em secreções respiratórias e outras identificam anticorpos antiinfluenza por ensaios sorológicos (WHO, 2002; OIE, 2008a; OIE, 2008b).

O sucesso do diagnóstico virológico depende da qualidade do material coletado e das condições de transporte e armazenamento até o seu processamento no laboratório (WHO, 2002; OIE, 2008a). O meio de transporte utilizado é outro fator crítico para o sucesso do isolamento e existem disponíveis diferentes formulações que já demonstraram ser eficientes na manutenção de vírus (DUBOVI & NJAA, 2008)

A coleta de espécimes clínicos para o isolamento viral e detecção direta de antígenos virais e ácidos nucléicos deve ser feita imediatamente após o início dos sinais clínicos, preferencialmente não ultrapassando três dias. A quantidade de vírus em um paciente está, geralmente, em seu ponto mais alto, no momento do aparecimento dos sintomas (WHO, 2002; OIE, 2008a).

#### **3.7.1. Identificação do agente**

Apesar do desenvolvimento de técnicas modernas e sofisticadas de diagnóstico, a identificação de vírus através de seu isolamento em um sistema biológico permanece sendo o método diagnóstico clássico. Como os

vírus frequentemente estão em pequenas quantidades no material clínico, a sua inoculação em um sistema susceptível permite a sua replicação e posterior identificação. Além disso, o isolamento do vírus a partir de material clínico permite que se obtenha o agente viável para ser utilizado em estudos antigênicos e genômicos do vírus isolado, o que é vital do ponto de vista de vigilância epidemiológica. O vírus isolado pode ainda ser usado para a produção de vacinas e testes de susceptibilidade a drogas. A maior restrição quanto à utilização do isolamento para diagnóstico virológico é o tempo necessário para obter-se o diagnóstico, podendo em alguns casos levar semanas (WHO, 2002; OIE, 2008a).

Os materiais clínicos preconizados são suabes nasofaríngeos, lavado nasal ou traqueal ou amostra de tecido pulmonar no caso da morte do animal (WHO, 2002; OIE, 2008a). Atualmente não existem dados publicados sobre a comparação de lavado nasal ou traqueal e suabes para o diagnóstico do vírus da influenza canina (CRAWFORD et al., 2005; DUBOVI & NJAA, 2008) .

Um estudo comparativo foi realizado utilizando-se 77 materiais coletado através de suabes nasais e 77 suabes faríngeos. Os resultados demonstraram que foi possível a detecção do vírus da influenza canina em 72% dos suabes nasais e apenas 32% dos suabes faríngeos (DUBOVI & NJAA, 2008) .

As amostras colhidas para o diagnóstico devem ser transportadas preferencialmente em gelo e colocadas em solução salina isotônica tamponada de fosfato (PBS), pH 7,0-7,4, com antibióticos. Os Antibióticos podem ser alterados em conformidade com as condições locais, mas geralmente são utilizados, por exemplo, penicilina (2.000 unidades / ml), estreptomicina (2 mg / ml), gentamicina (50 mg / ml) e 2% de fungizona (250 mg/ml ) para os tecidos e suabes traqueais. As suspensões devem ser tratadas o mais rapidamente possível, caso o tratamento imediato não seja possível as amostras podem ser armazenadas a 4 ° C até 4 dias. As amostras são submetidas ao tratamento com antibióticos e fungicidas por 1-2 horas e depois centrifugadas a 1500 g por 15 minutos para remover bactérias e detritos, sendo que para a inoculação será utilizado o sobrenadantes (OIE, 2008a).

### **a) Isolamento viral em ovos embrionados**

Geralmente são utilizados três ovos embrionados de 10-11 dias de incubação por amostra, inoculando-se 0,1 mL do material na cavidade alantóica ou amniótica. Após a inoculação o ovo é incubado a 34°C por 72 horas. Decorrido este período, o líquido alantóico e/ ou amniótico será coletado e o seu potencial hemaglutinante aferido pela prova da hemaglutinação (HA). As amostras que apresentarem positividade são submetidas à prova de inibição da hemaglutinação (HI) para serem caracterizadas antigenicamente (OIE, 2008a).

As principais vantagens desse método referem-se à boa sensibilidade, facilidade de manipulação, baixo custo e disponibilidade de matéria-prima. As maiores desvantagens são: risco de contaminação ambiental em caso de acidente, contaminação com fungos e bactérias.

Destaca-se a importância da origem dos ovos embrionados utilizados para o isolamento, é indispensável que sejam oriundos de galinha livres de anticorpos contra micoplasmas e do vírus da Newcastle, adquiridos junto a granjas que se enquadrarem neste perfil.

Todos os isolados devem ser enviados imediatamente para um laboratório de referência designado pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) ou pela Organização Mundial da Saúde (OMS) para que o subtipo isolado seja incluído no programa de vigilância global da influenza que monitora as variantes antigênica e a emergência de novos vírus.

### **b) Isolamento viral em cultivo celular**

O isolamento em cultivo celular baseia-se na inoculação do material suspeito previamente tratado em células cultivadas *in vitro* e a replicação do vírus é evidenciada pela produção do efeito citopático. A linhagem celular recomendada para o isolamento do vírus influenza é a MDCK, no entanto não é fácil a visualização do efeito citopático e requer pessoal especializado (WHO, 2002; OIE, 2008a).

Após sete dias da inoculação, ou se antes for observado efeito citopático, deve-se coletar o sobrenadante e realizar o teste de hemaglutinação ou hemadsorção, as amostras positivas são submetidas à caracterização

imediatamente. Os negativos, devem ser submetidos a outras passagens (WHO, 2002; OIE, 2008a).

Em geral, só considera-se o material negativo após cinco passagens em cultivo com ausência de efeito citopático. Essas cinco inoculações são realizadas para dar oportunidade aos vírus que estão em pequenas quantidades no inóculo, ou replicam lentamente no cultivo, ou de replicar-se e produzir patologias celulares em um número considerável de células de modo a serem reconhecidas e repete-se a técnica de detecção de antígeno ao final de cada passagem ((WHO, 2002; OIE, 2008a).

Durante os anos de 2005, 2007 e 2008 foram realizados vários isolamentos do vírus da influenza em cães através do cultivo celular (CRAWFORD et al., 2005; YOON et al., 2005; MAAS et al., 2007; PAYUNGPORN et al., 2008).

### **c) Reação de hemaglutinação (HA)**

A capacidade hemaglutinante do vírus influenza foi observada pela primeira vez por Hirst (1941) trabalhando com ovos embrionados infectados com o vírus influenza, observou que os eritrócitos dos embriões que entravam em contato com o líquido alantóide rico em vírus eram aglutinados e rapidamente sedimentavam. A observação desse fenômeno, atualmente conhecido como hemaglutinação viral, constitui-se num método rápido e simples de indicar a presença e a concentração de vírus que possuem atividade hemaglutinante.

O princípio empregado para constatação rotineira da hemaglutinação é o aspecto de sedimentação. A suspensão de hemácias é incubada em repouso em microplacas com o material suspeito, oriundo do isolamento em ovo ou cultivo celular, por um período de 30 minutos (WHO, 2002; OIE, 2008a).

Além dos fatores relacionados à ligação receptor/hemaglutinina (pH, concentração iônica do meio, temperatura) a concentração de hemácias e a quantidade de partículas virais influenciam de forma crítica os resultados da prova de hemaglutinação. O fenômeno de HA é sempre pesquisado em amostras de vírus recém-isolados, não somente visando a simplicidade do

ensaio, mas também objetivando estudos de virologia básica e taxonomia viral (WHO, 2002; OIE, 2008a).

#### **d) Enzimoimunoensaio – ELISA**

Em situações onde não há instalações laboratoriais disponíveis para o isolamento viral pode ser realizada a detecção direta do antígeno em secreções nasais através de um teste de ELISA que captura o antígeno viral utilizando um anticorpo monoclonal contra a nucleoproteína.

Chambers e colaboradores (1994) realizaram um estudo a partir de suabes nasofaríngeos utilizando o *Kit* comercial (Directigen FLU-A Test®, Becton Dickinson Microbiology Systems) empregado no diagnóstico de influenza humana para detectar nucleoproteína do vírus influenza em equinos e obteve resultado satisfatório no diagnóstico de influenza equina. O sucesso do diagnóstico foi possível, uma vez que esses *Kits* detectam uma nucleoproteína bastante conservada, quando comparada às proteínas de superfície e que são comuns a todos os vírus influenza (GORMAN et al., 1991). Pesquisadores obtiveram sucesso na detecção de influenza vírus em patos e suínos (RAYAN-POIRIER et al., 1992; SWENSON et al., 2001).

A disponibilidade desses Kits representou um grande avanço no diagnóstico da infecção de influenza, pois permite resultado rápido, em torno de 15 minutos, é um teste fácil, preciso, que dispensa pessoal qualificado e representa uma opção diagnóstica importante em locais onde não há condições de se realizar o isolamento viral, no entanto não deve ser utilizado em substituição as técnicas de isolamento viral (CHAMBERS et al., 1994).

O vírus influenza subtipo H3N8 e H3N2 foi detectado em cães através do teste de ELISA utilizando o *Kit* comercial (Animal genetics, Inc. Suwon, South Korea) (CRAWFORD et al., 2005; CASTLEMAN et al., 2010; SONG et al., 2009). No entanto, os testes em cães, não têm sido tão bem sucedidos como em eqüinos. A razão desse insucesso pode ser pela quantidade aparentemente baixa de partículas virais transmitidas aos cães, por essa razão não é recomendada a utilização do ELISA direto para detecção de casos isolados de influenza. Sua utilização foi bem sucedida durante a ocorrência de um surto da doença, onde foi observado um pico na concentração viral (DUBOVI & NJAA, 2008)

### **e) Técnicas moleculares**

Atualmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR), está sendo utilizada com muita frequência devido à elevada sensibilidade e rapidez quando comparada às outras técnicas para diagnóstico dos vírus influenza. Os primeiros estudos utilizando a técnica de PCR no diagnóstico de influenza foram realizados por Zhang & Evans (1991)

A reação de polimerização em cadeia pode detectar ínfimas quantidades de segmentos de DNA específicos (regiões alvo), determinados pelas sequências complementares de oligonucleotídeos sintetizados para este fim. Como o vírus influenza possui um genoma de RNA, é necessária a transcrição reversa “in vitro” para a síntese de uma fita de DNA complementar (DNAc), antes da amplificação por PCR. A enzima utilizada para sintetizar essa reação é uma polimerase conhecida como Transcriptase reversa (RT)(WHO, 2002; OIE, 2008a).

A definição de primers específicos, o domínio da técnica de RT-PCR e o aprimoramento de outras modalidades da PCR vêm permitindo a rápida detecção e identificação de subtipos virais, além de possibilitar a obtenção de um cDNA que pode ser utilizado para obtenção de informações da sequência de nucleotídeos de qualquer segmento gênico do vírus influenza A que é bastante útil para compreensão filogenética e epizoótica deste vírus. Além disso, RT-PCR requer pequenas quantidades de RNA viral e pode ser feito a partir de amostras clínicas, de cultivados e materiais de necrópsia (OIE, 2008a).

Modificações e otimizações foram aplicadas às técnicas moleculares para redução do tempo de identificação, subtipagem e seqüenciamento. A circulação de vírus influenza A, nos animais e no homem, tem sido evidenciada com frequência, através da utilização de técnicas moleculares como: RT-PCR, PCR-multiplex, PCR-Real time, Nested-PCR e outras (SOARES et al., 2005; GOLONO, 2009; WHO, 2009). Várias detecções do vírus da influenza canina foram realizadas através do emprego da técnica de RT-PCR e Real Time RT-PCR (CRAWFORD et al., 2005; YOON et al. 2005; SONGSERM et al. 2006; MAAS et al., 2007; PAYUNGPORN et al., 2008; GIESE et al. 2008; CASTLEMAN et al., 2010)

### 3.7.2. Provas sorológicas

#### a) Reação de inibição da hemaglutinação (HI)

A adição prévia de anticorpos específicos anti-hemaglutinina à suspensão de vírus, altera a ligação da hemaglutinina viral com os receptores da hemácia, permitindo a sedimentação normal da hemácia. Esta técnica é denominada de inibição da hemaglutinação e representa a técnica de escolha pela Organização Mundial de Saúde para a vigilância global de influenza (CDC, 2001).

Trata-se de uma técnica altamente sensível e específica, devido a que, unicamente, mede anticorpos dirigidos contra a hemaglutinina viral. A rapidez, sensibilidade, especificidade e o baixo custo da técnica fazem com que seja empregada em muitos laboratórios para a caracterização de antígenos e/ou detecção de anticorpos (WHO, 2002; OIE, 2008a).

A detecção de anticorpos fundamenta-se na incubação do soroteste (em diferentes diluições) contra uma quantidade fixa de vírus (pré-determinada), frente à suspensão de hemácias. A caracterização antigênica é realizada após a confirmação do vírus isolado pela técnica de hemaglutinação. Feito isto, o vírus isolado é colocado para reagir frente a um painel de soros hiperimunes específicos contra influenza canina, e somente depois as hemácias são adicionadas. São empregados soros hiperimunes representando amostras antigenicamente diferentes e de acordo com a especificidade da ligação antígeno-anticorpo, pode-se determinar sua característica antigênica (WHO, 2002; OIE, 2008a).

Alguns cuidados devem ser tomados ao se utilizar esta técnica: atualização constante do painel de anti-soros, remoção dos inibidores e aglutinantes inespecíficos presentes nos soros, padronização da quantidade de vírus utilizada em cada teste.

Estudos realizados com o subtipo H3 verificaram que este subtipo aglutina hemácias de perus de forma mais eficiente que as hemácias de galinha. Essa modificação resultou em títulos de inibição da hemaglutinação quatro vezes maiores quando se utilizava as hemácias de perus (CRAWFORD et al., 2005; KARACA et al., 2007).

## **b) Enzimoimunoensaio – ELISA**

O teste de ELISA foi descrito pela primeira vez em 1971 e desde então tem sido considerado uma das mais importantes técnicas de diagnóstico. O ELISA pode ser utilizado para detectar a presença de antígeno ou de anticorpos. O antígeno (Ag - vírus) ou anticorpo (Ac) é imobilizado (fixado) na microplaca de poliestireno (superfície sólida). Após a incubação da amostra teste sobre o antígeno ou anticorpo fixado na placa, haverá a formação de um complexo antígeno-anticorpo. Posteriormente, uma anti-gamaglobulina conjugada com a peroxidase é adicionada, e ligar-se-á onde houver um Ac específico no poço. Então, uma solução substrato/cromógena será adicionada. Na presença da enzima (peroxidase), o substrato é convertido em um produto que reagirá com o cromógeno, gerando um produto de coloração diferenciada, neste caso será de cor azul ou verde

Vários estudos sorológicos evidenciaram a circulação do vírus da influenza canina através da técnica de ELISA (YOON et al. 2005; SONGSERM et al. 2006; MAAS et al., 2007; GIESE et al. 2008).

## **3.8.Tratamento**

Embora a vacinação seja a ferramenta de primeira escolha para a prevenção da influenza, os antivirais específicos são medicamentos de grande relevância na prevenção e controle da influenza. Atualmente estão disponíveis quatro medicamentos antivirais específicos para influenza: os fármacos clássicos amantadina e rimantidina, e os antivirais de segunda geração oseltamivir e zanamivir, sendo que estes dois últimos também foram licenciados pelas autoridades sanitárias brasileiras e encontram-se disponíveis no mercado desde 2000 (MUNFORD & CHAMBERS, 1998; CDC, 2001; FORLEO-NETO et al., 2003)

No entanto, durante os casos de influenza canina descritos na literatura os animais infectados não receberam tratamento por antivirais. Foram utilizadas algumas medidas terapêuticas como hidratação, antiinflamatórios não-esteroidais e nas complicações envolvendo infecções bacterianas secundárias fez-se necessário o uso de antibióticos de amplo espectro. Antitussígenos não são muito eficazes na redução da frequência e duração de tosse, e não deve ser usado em cães com tosse produtiva. Com exceção dos

casos graves e fatais, a grande maioria dos casos foram autolimitantes (CRAWFORD et al., 2005; SONGSERM et al., 2007; PAYUNGORN et al., 2008; KIRKLAND et al., 2010).

### **3.9. Prevenção e controle**

Como define a Lei Orgânica da Saúde (Lei 8.080/90), a vigilância epidemiológica é "o conjunto de atividades que permite reunir a informação indispensável para conhecer, a qualquer momento, o comportamento ou história natural das doenças, bem como detectar ou prever alterações de seus fatores condicionantes, com o fim de recomendar oportunamente, sobre bases firmes, as medidas indicadas e eficientes que levem à prevenção e ao controle de determinadas doenças" e baseado nessa mesma lei podemos entender a vigilância sanitária como "o conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e de prestação de serviços de interesse à saúde" (BRASIL, 1990).

Com base nos aspectos citados acima e levando-se em consideração de que o único modo prático e eficaz de se controlar a influenza, até o presente momento, é através de um eficiente programa de vigilância e da imunização ativa de algumas espécies animais e do homem. Seria incoerente pensar na prevenção e controle sem considerar aspectos fundamentais de vigilância epidemiológica e sanitária, dessa forma é importante ressaltar que a política de vacinação, a capacidade de diagnóstico dos órgãos oficiais e o trânsito dos animais, sem o devido controle, são os fatores determinantes na disseminação do vírus influenza entre as espécies animais e o homem. No entanto, é importante destacar que a única vacina animal anti-influenza comercializada no Brasil se destina aos equídeos, de forma que apenas a população equídea apresenta cobertura vacinal (KAWAOKA & WEBSTER, 1989; LAI et al., 1994).

No Brasil, as vacinas comercializadas para uso em equinos são exclusivamente importadas, e, por este motivo, ficam obrigadas ao registro no Ministério da Agricultura para efeito de licenciamento (DECRETO-LEI n° 467 de 13/02/1969) e estão sujeitas às exigências da Portaria n° 301 de 19/03/1996, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) que dispõe

sobre as normas complementares anexas, elaboradas pela secretaria de Defesa Agropecuária, a serem observadas pelos estabelecimentos que fabriquem e ou comercializem produtos veterinários (BRASIL, 1969; BRASIL, 1996)

Somente os produtos veterinários produzidos em âmbito nacional deverão satisfazer aos requisitos de controle de qualidade contidos no art. 21 da Portaria nº 301 de 19/03/1996 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Dessa forma, os produtos biológicos importados, apenas serão submetidos à análise de sua qualidade mediante o pedido formal de um médico veterinário e não como um procedimento de rotina, suscitando à dúvida à qualidade das vacinas que chegam ao seu consumidor final, os equídeos. Além disso, na prática veterinária não encontramos uma legislação que garanta a fiscalização das clínicas, hospitais, hípicas, jóqueis que realizam a prática da vacinação, nos moldes descritos pela Portaria Conjunta ANVISA/FUNASA, que enfatiza, dentre outros aspectos, a importância de uma adequada cadeia de frios para garantia da qualidade dos produtos biológicos (BRASIL, 1996; BRASIL, 2000).

Sabe-se que o vírus influenza sofre mutações, na ordem de  $1.82 \times 10^{-3}$  nucleotídeos e de  $1.41 \times 10^{-3}$  aminoácidos por sítio por ano (ENDO et al., 1992) e que essas alterações podem comprometer a eficácia vacinal caso as amostras vacinais não representem a nova amostra circulante (YATES & MUNFORD, 2000). A vacina formulada para os eqüinos, diferentemente de como ocorre para os humanos, não sofre revisão periódica, sendo a mesma cepa utilizada por mais de 30 anos (MUNFORD & CHAMBERS, 1998). A última amostra analisada proveniente do Brasil data de 1987 e revelou homologia de 99% com a A/equine/Miami/63 (ENDO et al., 1992), durante muitos anos não houve informações disponíveis sobre o vírus de influenza eqüina que estão circulando no Brasil.

Em 2001, foi registrado o último surto de influenza eqüina no Estado do Rio de Janeiro, nesse episódio animais vacinados foram infectados. Após pesquisa virológica e caracterização biomolecular confirmou-se que o vírus Influenza tipo A, subtipo H3N8, foi o agente responsável pelo surto e que a amostra vacinal A/eqüino/Kentucky/92, utilizada no Brasil, não é representativa do vírus que circulou durante o surto de 2001 (LOUREIRO, 2004). Os resultados desse trabalho ratificam a importância da revisão

periódica das vacinais comerciais, afim de garantir que estas contenham cepas virais que apresentem grande homologia em relação as cepas circulantes e com base no último surto Loureiro e colaboradores (2002) sugerem que a vacina utilizada no Rio de Janeiro contenha em sua formulação algumas das duas amostras representantes da linhagem americana: A/eqüino/Newmarket/1/93 ou A/eqüino/Kentucky/94 na tentativa de se evitar outros surtos de influenza eqüina e a disseminação do vírus para outras espécies e para o homem (LOUREIRO, 2004).

Outro aspecto destacado por Loureiro (2004) refere-se a eficiência do esquema vacinal utilizado pelos principais estabelecimentos eqüestres do Brasil, que preconiza a primeira dose aos seis meses de vida, seguido por uma segunda dose seis meses após a primeira e reforço anual. Com o objetivo de avaliar a eficácia do esquema vacinal que utiliza um reforço anual Loureiro (2004) realizou um acompanhamento do título de anticorpos em 62 animais durante um ano e concluiu que uma dose como reforço anual não é suficiente para garantir imunidade protetora aos animais e sugeriu uma dose adicional 6 meses após a primeira dose.

No momento, em que ocorreram os surtos de influenza canina nos Estados Unidos não existiam vacinas licenciadas contra o vírus da influenza canina. Para aqueles em áreas de alto risco, surgiu a questão quanto à possível utilização das vacinas eqüinos, dada a estreita relação genética entre os vírus eqüino e vírus da influenza canina (DUBOVI & NJAA, 2008).

Karaca e colaboradores (2007) no intuito de avaliar a resposta imunológica dos caninos frente a vacina contra influenza, desenvolveram um estudo utilizando uma vacina de Poxvírus de canário recombinante com o gene que codifica a hemaglutinina (H3) das amostras A/equine/Kentucky/94 (vCP1529) e A2/equine/Ohio / 03 (vCP2242). Todos os cães foram examinados e tiveram amostras de soros coletadas nos dias 1, 7, 13, 21, 28, 35 e 42, as quais foram submetidas à Prova de Inibição da Hemaglutinação (HI) e de vírus neutralização (VN) para detecção de anticorpos contra os antígenos, A/Canine/FL/43/04 e A/Canine/NY/115809/05, do vírus da gripe canina. Os resultados obtidos confirmaram que a vacina utilizada induziu a formação de anticorpos e destacam que a utilização do imunógeno pode reduzir substancialmente o impacto da transmissão do vírus da influenza canina e ter grande valia na prevenção dessa enfermidade.

Em 2008, foi realizado um estudo avaliando a resposta induzida por uma vacina recombinante de herpesvirus eqüino tipo 1 (EHV-1) e gene que expressa a glicoproteína H3, administrada pela via subcutânea e intranasal, em cães e camundongos. Além disso, foi realizado o desafio com a amostra A/canine/PA/10915-07 do vírus da influenza canina. Os resultados demonstraram uma redução significativa nos sinais clínicos e na excreção viral dos animais vacinados, em comparação com controles não vacinados, representando uma alternativa valiosa para a proteção dos cães contra a doença clínica induzida pelo vírus influenza e na redução da disseminação do vírus (ROSAS et al., 2008)

Deshpande e colaboradores (2009) dirigiram um estudo que avaliou a eficácia de uma vacina inativada, contra o vírus da influenza canina, administrada em cães da raça Beagle, com 6 - 8 semanas de idade, que posteriormente foram desafiados com amostra virulenta do vírus influenza. Os filhotes vacinados desenvolveram títulos de anticorpos após a vacinação, a gravidade dos sinais clínicos e à magnitude e duração da excreção viral foram significativamente menores nos filhotes vacinados em comparação com filhotes controle.

Em junho de 2009, foi aprovada a primeira vacina contra o vírus da influenza canina (H3N8) para cães (Intervet / Schering-Plough Animal Health). Embora a vacina não impeça a infecção, estudos de eficácia têm mostrado que a vacinação reduz significativamente a severidade e a duração da doença clínica, incluindo a diminuição da incidência e gravidade das lesões. Além disso, a vacina reduz a quantidade e o tempo de eliminação viral. A vacina contra a gripe canina destina-se principalmente para cães que participam de exposições, corridas e outros eventos de aglomeração e àqueles mantidos em abrigos, alojados em instalações públicas, especialmente em comunidades onde o vírus é predominante (CRAWFORD, 2009) .

O vírus da influenza se dissemina rapidamente e a aglomeração de animais é um fator de risco para essa virose, desta forma é imprescindível a adoção de boas práticas de higiene e biossegurança, principalmente nas exposições, eventos, clínicas, alojamentos, canis e outros. Medidas simples com limpeza e desinfecção das instalações, tigelas e outros fômites podem reduzir consideravelmente o risco de infecção, além disso, os trabalhadores, tratadores e médicos veterinários devem utilizar protocolos de doença

contagiosa para todos os cães com sintomas respiratórios. Isso inclui o isolamento e quarentena dos cães doentes, evitar o compartilhamento de utensílios, realizar a limpeza e desinfecção de materiais e roupas para evitar que os mesmos atuem como disseminadores do vírus a população canina.

Considerando os aspectos apresentados acima, torna-se imprescindível destacar que a política de vacinação e a qualidade das vacinas são tão importantes, quanto à capacidade de diagnosticar e avaliar os animais que serão transportados, que constituem os maiores veículos de propagação da doença entre os equídeos, os cães e outros hospedeiros susceptíveis (KAWAOKA & WEBSTER, 1989; LAI et al., 1994).

### **3.9.1. Vigilância da Influenza**

A Organização Mundial de Saúde (OMS) está em constante alerta às variações deste vírus desde 1947, onde foi estabelecida uma rede de cooperação internacional de vigilância aos vírus influenza. Atualmente esta rede é composta por quatro principais Centros de Referência: Atlanta (EUA), Melbourne (Austrália), Londres (UK) e Japão, sendo estes responsáveis pela identificação e caracterização antigênica e genômica de novas cepas virais. Os dados e as amostras virais são enviados de 93 países do mundo num total de 121 laboratórios participantes. De maneira semelhante a outros países, no Brasil, estão credenciados pela OMS como Centros de Referência para Influenza as seguintes instituições: o Instituto Evandro Chagas (IEC/SVS/MS), o Instituto Adolfo Lutz (IAL/SP) e o Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/MS). Na organização interna da rede de laboratórios do país, os dois primeiros estão classificados como de Referência Regional e o último como de Referência Nacional (WHO, 2007).

No Brasil, vigilância da influenza está implantada desde o ano 2000. Baseia-se na estratégia de vigilância sentinela, composta por 62 unidades de saúde/pronto atendimento e laboratórios. Esta rede informa semanalmente a proporção de casos humanos de síndrome gripal atendidos nas unidades sentinela e os tipos de vírus respiratórios que estão circulando em sua área de abrangência, agregados por semanas epidemiológicas. Para dar suporte a esse sistema, desenvolveu-se um Sistema de Informação da Vigilância Epidemiológica da Influenza, o SIVEP - Gripe, com transmissão de

dados *on line*, garantindo assim a disponibilização dos dados em tempo real (SVS, 2005a).

As unidades de saúde sentinelas estão distribuídas em todas as unidades federadas, sendo três em municípios de fronteira internacional. Além de permitir o monitoramento da demanda por atendimento por síndrome gripal nas unidades sentinelas, este sistema tem entre seus objetivos o monitoramento e identificação dos vírus respiratórios que circulam no país, o que contribui para a adequação imunogênica da vacina contra influenza utilizada anualmente, além da identificação de novas cepas de vírus influenza (SVS, 2010a).

Durante a pandemia de influenza H1N1/2009, as atividades das unidades sentinelas se mantiveram e, em alguns casos foram intensificadas. Neste período, a rede laboratorial de diagnóstico passou a priorizar o processamento de amostras de casos graves e óbitos suspeitos por influenza pandêmica, processadas em sua maioria nos laboratórios de referência nacional, utilizando a técnica do RT-PCR, enquanto que as amostras referentes a casos de Síndrome Gripal foram processadas apenas nos LACEN estaduais (Laboratórios Centrais de Saúde Pública), por imunofluorescência, sendo seus resultados registrados no SIVEP\_GRIPE (SVS, 2010a).

Inicialmente, o processamento das amostras de secreção respiratória para o diagnóstico de vírus de influenza pandêmica (H1N1) 2009 foi realizado somente pelos Laboratórios de Referência no Brasil: Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo; Instituto Evandro Chagas (IEC) no Pará; e Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no Rio de Janeiro, responsáveis pela caracterização de cepas virais (SVS, 2010a).

No período de maio de 2009 a janeiro de 2010 foram processadas 76.585 amostras por RT-PCR em tempo real, sendo 28.256 (36,9%) dessas positivas para influenza pandêmica, 3.464 (4,5%) positivas para influenza A ou B sazonal e 44.865 (58,6%) foram negativas. A região Sudeste apresentou a maior proporção de amostras positivas em relação ao total (55,7%), seguida das regiões Sul (32,2%), Centro-Oeste (5,1%), Nordeste (3,8%) e Norte (3,2%) (SVS, 2010).

A influenza não é doença de notificação compulsória. Os dados da vigilância sentinela são informados em um sistema de informação específico (SIVEP). No entanto, considerando o potencial epidêmico desta doença,

qualquer suspeita de surto comunitário ou institucional deve ser imediatamente comunicada à Secretaria Estadual de Saúde e Coordenação de Vigilância de Doenças de Transmissão Respiratória e Imunopreveníveis da SVS/MS, com vistas a possibilitar a coleta, transporte e análise laboratorial das amostras (SVS, 2005a).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) incentiva os países membros a elaborarem ou revisarem seus planos de contingência para o enfrentamento de uma possível nova pandemia. O Ministério da Saúde (MS) instituiu formalmente o seu Comitê para preparação deste plano em 2003, composto inicialmente por profissionais de distintas áreas técnicas do próprio MS, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Organização Pan Americana de Saúde/OMS e pelas Sociedades Brasileiras de Pneumologia, de Medicina Tropical e de Virologia. Este comitê vem sendo ampliado na medida em que novas ações e estratégias são necessárias frente aos novos cenários epidemiológicos. Atualmente, participam representantes da Defesa Civil/Ministério da Integração, Gabinete de Segurança Institucional e Casa Civil da Presidência da República, dos Conselhos de Secretários Estaduais e Municipais de Saúde, do Conselho Nacional de Saúde, da Comissão Parlamentar de Saúde da Câmara Federal, entre outros, que estão se agregando às instituições anteriormente citadas (SVS, 2005c).

O Ministério da Saúde através da Secretaria de Vigilância em Saúde vem realizando monitoramento em aves migratórias nas principais rotas de migração da Costa Atlântica no Brasil, no intuito de detectar precocemente a circulação de cepas altamente patogênicas do vírus influenza. Por sua vez o Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento através do Programa Nacional de Sanidade Avícola vêm desempenhando o monitoramento dessa virose, promovendo treinamento de pessoal e se equipando para agir com segurança e rapidez em caso de uma emergência sanitária, além disso, os gestores do Programa de Sanidade dos Eqüídeos entenderam o importante papel desses animais na cadeia epidemiológica da influenza e encontra-se em discussão uma proposta de Instrução Normativa que estabelecerá regras e requisitos técnicos destinados aos participantes do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária, para a programação, coordenação e execução de ações de prevenção e controle da influenza eqüina (SVS, 2005c).

A OMS incentiva estudos a fim de obter dados a respeito da circulação dos subtipos de vírus influenza em todos os países com a finalidade de garantir manutenção da vigilância laboratorial. Essa conduta permite a análise das variações antigênicas estimuladas pelos constantes rearranjos genéticos sofridos pelo vírus influenza e estimulou a partir de 1999 a realização de duas reuniões anuais, para definir quais as cepas que irão compor a vacina a ser utilizada em cada hemisfério (SVS, 2005a)

No entanto, em vários estados brasileiros, não se conhece a sazonalidade desse vírus e nem as cepas que predominantemente circulam na população humana e animal. Tornando urgente e importante o desenvolvimento de estudos que demonstrem quais são as cepas que predominantemente circulam na nossa população, bem como definir a sazonalidade da infecção.

### **3.10. Relação homem - cão**

As evidências mais antigas da amizade entre o homem e os cães datam de 12 mil anos antes de Cristo, em que ossos de homens e cães aparecem na mesma sepultura. Na pré-história foram encontrados sítios arqueológicos dessa época em que o animal doméstico era enterrado em posição de destaque ao lado do seu provável dono, mas a grande mudança deu-se a partir dos tempos modernos, com a criação de cães para a função principal de guarda da propriedade, de tração de carroças e trenós, ou utilidade para acompanhar tropeiros, agricultores, além da condição de estimação. Havia uma distinção social entre os cães imposta pelos homens e, no século XVIII, o cão era conhecido como “o mais inteligente de todos os quadrúpedes conhecidos” e louvado como “o servo mais fidedigno e a companhia mais humilde do homem” (BERZINS, 2000).

Ter um animal de estimação não é apenas uma questão de lazer ou de companhia. A medicina está descobrindo que eles também podem ser benéficos para a saúde humana. Estudos do *American Journal of Cardiology* mostram que pessoas, ao interagirem com animais, constantemente tendem a apresentar níveis controlados de estresse e de pressão arterial, além de estarem menos propensas a desenvolver problemas cardíacos (VICÁRIA, 2003).

Em 2000, Berzins observou em estudos realizados nos Estados Unidos e na Europa uma redução do tempo de recuperação das doenças e uma maior sobrevivência aos indivíduos que possuem animais de estimação e que foram acometidos por cardiopatia isquêmica. Percebe-se que, nessas situações, a presença do animal resultou na redução da ansiedade e diminuição de depressão.

Em termos psicológicos, os cães, estão sendo utilizadas com frequência em terapias para equilibrar emoções em casos de perdas, luto, depressão, desilusões e outros. Uma interação que vem crescendo espantosamente nos últimos anos é o convívio dos idosos com os cães, esses animais surgem como verdadeiros companheiros que aliviam os dias de solidão dessas pessoas (KASSIS, 2002).

As iniciativas de Terapia Assistida com Animais (TAA) consistem de visitas programadas com animais devidamente treinados para o contato com pessoas estranhas, principalmente idosos, crianças e deficientes físicos e mentais. Esse contato normalmente desemboca em situações estimulantes, nas quais são encorajados a viver aquele momento de interação com o cão além de praticar exercícios leves, incentivados a se mover e a fazer movimentos que antes pareciam impossíveis de conseguir. O contato com os animais aumenta a auto-estima, tendo em vista que sua rotina é quebrada, proporcionando um estímulo para que tornem o seu tempo útil e continuem povoando suas vidas de novas descobertas, não se sentem mais sozinhos ou excluídos pela presença do cão e do voluntário do projeto de TAA, pela possibilidade de fazer novos amigos (KASSIS, 2002).

De acordo com a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação, a ANFAL Pet, o Brasil tem 32 milhões de cães e 16 milhões de gatos. Acredita-se que seja a segunda maior população no planeta, inferior apenas à existente nos Estados Unidos, nos últimos 15 anos, o número de cães quase triplicou no Brasil (ANFAL Pet, 2009)

A pesquisa Radar Pet, realizada entre março e abril de 2008 em oito metrópoles brasileiras, foi o primeiro grande levantamento sobre a relação dos brasileiros com os animais de estimação. Os resultados obtidos fornecem uma visão da intimidade dos brasileiros com seus cães e gatos e demonstraram que estão presentes em 44% dos lares das classes A, B e C, nesses lares 23% dos cães dormem nos quartos de seus donos, nas

residências da classe A, são 35%. Em lugares como Porto Alegre, Curitiba e Campinas os cães já circulam em mais da metade das casas (COMAC, 2008)

A Organização Mundial de Saúde considera que, em países emergentes, a proporção média da população canina varie de 1:10 a 1:6, ou seja, cerca de 10,0 a 16,7% da população humana. Este é um parâmetro variável de município para município, podendo atingir valores de até 1:1. No Brasil a relação é de um cão para cada seis habitantes e um gato para cada 16 habitantes. Dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) apontam que nos últimos quatro anos houve um aumento de 17,6% no número de cães e gatos no Brasil (IBGE, 2000).

### **3.11. População de Idosos no Brasil**

As doenças respiratórias são hoje uma das principais causas de internações e óbitos entre idosos. Vários autores têm demonstrado o crescimento global da incidência de infecções agudas respiratórias e suas complicações em indivíduos maiores de 65 anos, em diversos países, inclusive no Brasil. Dados do sistema de Vigilância Epidemiológica do Brasil mostram que as doenças respiratórias estão entre as principais causas de óbito entre as pessoas maiores de 60 anos (SVS, 2004).

Durante epidemias de influenza, aproximadamente 90% dos óbitos atribuídos são observados entre os idosos. Embora a mortalidade aumente com a idade, a presença de uma co-morbidade de alto risco eleva o risco de óbito em cerca de 20 vezes, e a presença de duas ou mais condições de alto risco eleva o risco em cerca de 30 vezes. As complicações são mais comuns em idosos e indivíduos debilitados por essa razão estes segmentos são inseridos no grupo de risco da influenza (SVS, 2004; CDC, 2002)

A preocupação com os idosos aumenta a cada surto de gripe, uma vez que, os idosos constituem o segmento que mais cresce na população brasileira, devido a um processo de transição demográfica que se iniciou a partir dos anos 60, quando o grupo etário dos adultos e idosos passou a crescer mais que os outros grupos etários. Estima-se que no período de 1950 a 2025, o grupo de idosos no Brasil deverá ter aumentado em 15 vezes, enquanto a população total em cinco. O País ocupará, assim, o sexto lugar quanto ao contingente de idosos, alcançando, em 2025, cerca de 32 milhões

de pessoas com 60 anos ou mais de idade (LIMA-COSTA & BARRETO, 2003; BRASIL, 1996).

Por essa razão, no Brasil, a recomendação oficial para a vacinação contra influenza tem sido direcionada aos idosos. Em 1999, o Ministério da Saúde decidiu incluir no Programa Nacional de Imunização a vacinação contra influenza para indivíduos com mais de 65 anos de idade, alcançando cobertura vacinal acima de 80 % em todo o país. A partir de 2000, as autoridades de saúde do governo federal diminuíram a faixa etária de corte para a vacinação anual contra influenza de 65 para 60 anos de idade (BRASIL, 1996; BRASIL, 2003)

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1.GERAIS**

- Avaliar os níveis de anticorpos presentes para o subtipo H1N1, H2N2 e H3N8, em cães, da zona oeste, da cidade do Estado do Rio de Janeiro

### **4.2.ESPECÍFICOS**

- Comparar os resultados obtidos no presente estudo com outras investigações soropidemiológicas envolvendo o vírus da gripe canina.

## **5. MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1. MATERIAIS**

#### **5.1.1. Amostras**

As amostras de soros são provenientes de cães oriundos da zona oeste do Estado do Rio de Janeiro assistidos em clínicas veterinárias. As amostras foram selecionadas aleatoriamente. Foram sorteados 304 soros para realização da prova de Inibição da Hemaglutinação (HI) frente aos subtipos H3N8, H2N2 e H1N1 do vírus influenza A.

As amostras utilizadas fazem parte de bancos de soros mantidos em clínicas veterinárias da zona oeste do Estado do Rio de Janeiro. Os soros foram sorteados e não houve qualquer direcionamento quanto ao sexo, raça, idade, peso ou situação clínica do animal. Fizeram parte do estudo animais saudáveis e enfermos, com ou sem sintomas respiratórios.

#### **5.1.2. Antígenos**

Foram utilizadas amostras de vírus influenza A cedidas pela Área de Virologia do Laboratório de Biologia Animal – Virologia da Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro (PESAGRO/RJ).

- A/New Caledonia/20/99 (H1N1)
- A/CAP/04 (H2N2).
- H3N8 (isolado em 2001 no Estado do Rio de Janeiro)

#### **5.1.3. Ovos embrionados**

A reativação das amostras virais foi realizada utilizando-se ovos embrionados com 10 dias de incubação, oriundos de galinhas livres de anticorpos contra as cepas objeto do presente estudo, micoplasmas e do vírus da Doença de Newcastle, adquiridos junto à granja que se enquadrava neste perfil.

#### 5.1.4. Hemácias

As suspensões de hemácias, utilizadas para a remoção de hemaglutinantes inespecíficos e as provas de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI), foram obtidas por punção na veia braquial de galinhas em solução de Alsever (ANDRADE, 2000). As aves doadoras eram provenientes de plantéis com perfil sorológico negativo para as cepas objeto do presente estudo, Micoplasma e Doença de Newcastle, criadas e mantidas em isolamento, especialmente para esse fim.

#### 5.1.5. Solução de tampão fosfato (PBS- *Phosphate buffered saline*)

O PBS teve seu pH mantido em 7,2 e foi utilizado como veículo nas diferentes fases do projeto.

##### a) Solução mãe

Solução A: 9,08 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  → 1000mL água destilada

Solução B: 9,47 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  → 1000mL água destilada

##### b) Solução de trabalho

Solução A → 285 mL

Solução B → 715 mL

NaCl → 8,5 g

Autoclavar a 115 °C durante 10 minutos.

#### 5.1.6. Caolim

Para eliminação de inibidores da hemaglutinação, os soros foram descongelados a temperatura ambiente ( $\pm 25^\circ\text{C}$ ), homogeneizados e tratados com Caolim<sup>1</sup> a 25g em 100mL de uma solução tampão (PBS) pH 7,2 *overnight*.

---

<sup>1</sup> VETEC Ventiltechnik GmbH

### 5.1.7. Alsever

Foi utilizado durante a colheita de sangue, das galinhas doadoras, para obtenção das suspensões de hemácias utilizadas nas Provas de Hemaglutinação, Inibição da Hemaglutinação e no tratamento para remoção de aglutinantes inespecíficos.

Glicose (dextrose) $C_6H_{12}O_6$	→	20,5 g
Citrato de sódio $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	→	8,0 g
Ácido cítrico $C_6H_8O_7$	→	4,2 g
Água destilada e deionizada q.s.q.	→	1000 mL

## 5.2. MÉTODOS

### 5.2.1. Produção dos antígenos

Os antígenos foram inoculados pela via alantóica, em ovos embrionados SPF com 10 dias de vida, incubados a 34 °C, durante 72 horas. Decorrido este período, o líquido alantóico foi coletado e o seu potencial hemaglutinante aferido pela prova da hemaglutinação (HA), utilizando-se os líquidos alantóicos em diluições seriadas a partir de 1:2. O título hemaglutinante foi definido a partir da maior diluição capaz de exercer atividade hemaglutinante completa. O líquido alantóico hemaglutinante foi alíquotado e congelado a -20 °C até o momento de uso (COUCH & KASEL, 1995; OIE, 2008a)

### 5.2.2. Inativação dos antígenos

Antes de serem empregadas, nas provas de hemaglutinação (HA) e inibição da hemaglutinação (HI), as suspensões virais foram inativadas a 56 °C, durante 30 minutos (MOHANTY & DUTTA, 1983).

### **5.2.3. Suspensão de hemácias**

As suspensões de hemácias de galinhas utilizadas nas Provas de Hemaglutinação, Inibição da Hemaglutinação e no tratamento para remoção de aglutinantes inespecíficos são provenientes de plantéis com perfil sorológico negativo para as cepas objeto do presente estudo, Micoplasma e Doença de Newcastle. O sangue foi coletado em Alsever (ANDRADE, 2000) e centrifugado a 600 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, e o precipitado de hemácias lavado três vezes em PBS pH 7,2. Em cada lavagem o sangue foi centrifugado a 600 x g por 10 minutos. Após o processo de lavagem, o precipitado foi diluído em PBS pH 7,2 e mantido a 4° C por até 3 dias (OIE, 2008a).

### **5.2.4. Prova de hemaglutinação (HA)**

A atividade hemaglutinante das amostras virais foi investigada pela prova de hemaglutinação (HA), utilizando-se os líquidos alantóicos em diluições seriadas a partir de 1:2 em PBS, em microplacas de 96 cavidades, e adicionadas igual volume de suspensão de hemácias 1%. O título hemaglutinante foi definido a partir da maior diluição capaz de exercer atividade hemaglutinante completa (COUCH & KASEL, 1995; OIE, 2008a).

Cada amostra foi feita em duplicata e em todas as placas foram feitos controles de hemácias. A reação negativa foi observada pela sedimentação das hemácias no fundo do poço, formando um botão redondo de limites nítidos. Na reação positiva observa-se um fino filme com bordos irregulares de hemácias aglutinadas recobrimdo a superfície do fundo da placa.

### **5.2.5. Avaliação sorológica**

#### **a) Tratamento dos soros**

Para eliminação dos inibidores inespecíficos, todos os soros foram descongelados a temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) e homogeneizados. Em seguida, foram colocados 200  $\mu\text{L}$  de cada soro, aos quais foram adicionados 800  $\mu\text{L}$  de Caolin 25% e 1000  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato (PBS) a 0,1% albumina

fetal bovina, pH 7,2. A mistura foi homogeneizada e incubada por, aproximadamente, 12 horas, a 37°C e, em seguida, centrifugada a 600 x g por 30 minutos, coletando-se os sobrenadantes (BALOWS, HAUSLER & HERMMANN, 1996).

Todos os soros foram previamente testados frente à suspensão de hemácia a 1% e aqueles que apresentaram qualquer atividade hemaglutinante, foram selecionados e tratados para a remoção destes aglutinantes inespecíficos. Dentre os 304 soros analisados apenas 10 receberam tratamento.

Para remoção de hemaglutinantes inespecíficos foram acrescentados a cada 1000µL de soro 100 µL de suspensão de hemácias de galinha a 50% em PBS, incubando-se por uma hora a temperatura ambiente, seguida de centrifugação a 600 x g, durante dez minutos, a  $\pm 8$  °C . O sobrenadante foi coletado e estocado a -20 °C, até o momento do uso. Este procedimento foi repetido até que o soro estivesse livre de aglutinantes inespecíficos (BALOWS, HAUSLER & HERMMANN, 1996).

#### **b) Prova de inibição da hemaglutinação (HI)**

A prova de HI foi realizada pelos métodos convencionais, em microplacas de 96 cavidades, fundo em “U”. Os soros obtidos, previamente tratados foram diluídos a 1:10, 1:20, 1:40 e 1:80, em PBS 0,1% albumina fetal bovina. Cada 50 µL das diluições foi colocado a reagir frente a 50 µL da suspensão inativada dos três antígenos: H1N1, H2N2 e H3N8 cada um padronizado, contendo 4 (quatro) unidades hemaglutinantes (UHA). A mistura soro/antígeno foi incubada por 30 minutos, a 4 °C. Igual volume de uma suspensão a 1% de hemácias de galinha, lavadas com PBS 0,1% albumina fetal bovina foi adicionada. O título inibidor foi definido a partir do inverso da maior diluição de soro capaz de inibir completamente a atividade hemaglutinante (COUCH & KASEL, 1995; OIE, 2008a).

Em todas as microplacas foram reservados poços para o controle de hemácias e dos antígenos padrão. A presença de anticorpos, reação positiva, foi caracterizada pela sedimentação das hemácias no fundo do poço onde, observou-se a formação de um botão de hemácias. Na ausência de

anticorpos, reação negativa observou-se um fino filme com bordos irregulares de hemácias aglutinadas recobrimdo a superfície do fundo do poço.

## 6. RESULTADOS

Do total de 304 soros analisados pela prova de HI, 214 (70,4%) soros apresentaram reatividade com títulos entre 10 e  $\geq 80$  para o subtipo H3 linhagem americana, 93 (30,6%) soros para o subtipo H2 e 146 (48%) positivos para o subtipo H1 (Tabela 3 e Figura 5).

Na diluição 1:10, do total de 304 soros analisados verificou-se que 56 (18,4%) e 82 (27%) soros reagiram para o subtipo H2 e H1, respectivamente. Nessa mesma diluição, dos 304 soros analisados frente ao subtipo H3, 11 foram positivos, representando 3,6% da amostragem (Tabela 3 e Figura 5).

Os resultados das diluições 1:20, constatou-se que 33 e 49 soros reagiram para H2 e H1, representando respectivamente 10,8% e 16,1% do total de 304 soros analisados. Nessa mesma diluição, dos 304 soros analisados frente ao subtipo H3, 53 foram positivos, representando 17,4% da amostragem (Tabela 3 e Figura 5).

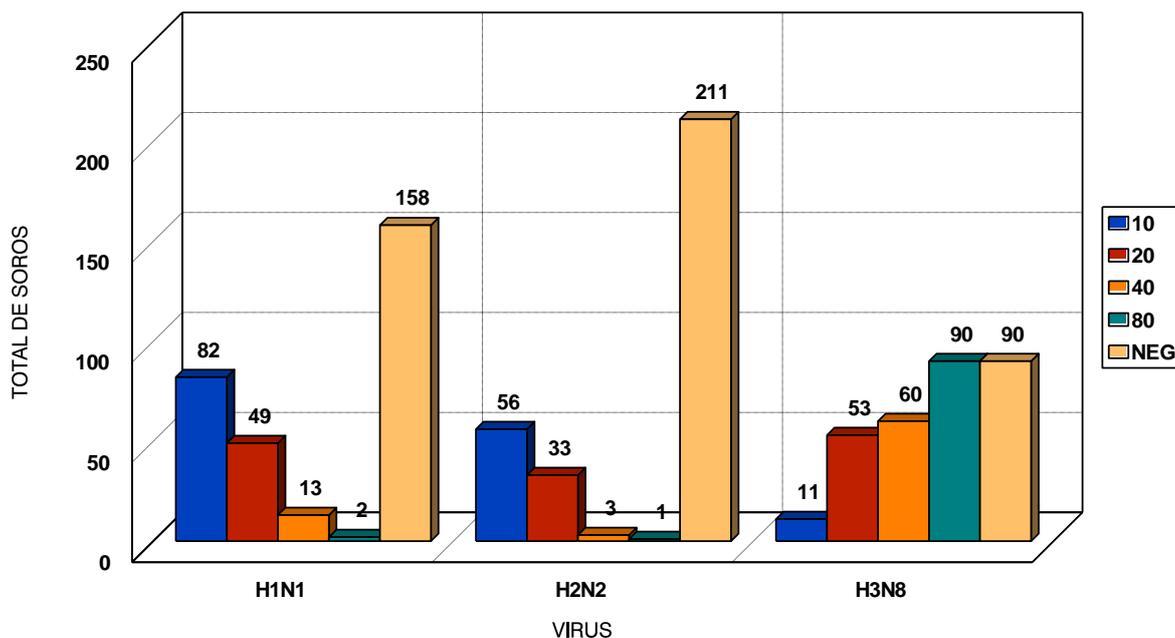
Na diluição 1:40, das 304 amostras analisadas, 03 e 13 soros reagiram para H2 e H1, representando respectivamente 1% e 4,3%. Nessa mesma diluição, dos 304 soros analisados frente ao subtipo H3, 60 foram positivos, representando 19,8% da amostragem (Tabela 3 e Figura 5).

Os resultados obtidos na diluição  $\geq 1:80$  demonstram que 01 e 02 soros reagiram para os subtipos H2 e H1, representando respectivamente 0,4% e 0,6% do total de soros analisados. Para o subtipo H3, 90 amostras foram soropositivas, o que equivale a 29,6% no total de 304 soros analisados (Tabela 3 e Figura 5).

Considerando a circulação conjunta dos três subtipos do vírus influenza foi possível observar que das amostras positivas, 50 soros reagiram para todos os 3 subtipos do vírus influenza testados, representando 16,45 % do total de soros. Nove soros reagiram somente para o subtipo H2, 26 somente para o subtipo H1 e 79 para o subtipo H3, o que equivale a 3% , 8,6% e 26% do total de 304 amostras analisadas. O número de amostras que não reagiram para nenhum dos subtipos testados atingiu valores de 15,5% (Quadro 2 e Figura 6).

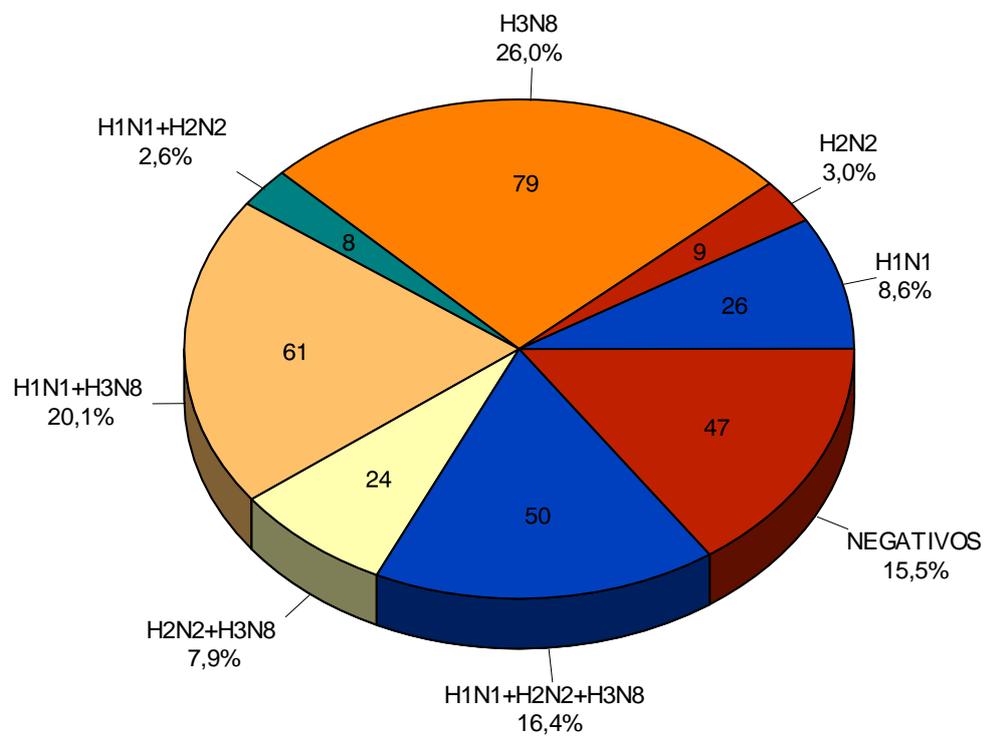
**Tabela 3.** Títulos de anticorpos para os subtipos H3N8, H2N2 e H1N1.

Título	Soros Reagentes H3N8	Soros Reagentes H2N2	Soros Reagentes H1N1
10	11 (3,6%)	56 (18,4%)	82 (27%)
20	53 (17,4%)	33 (10,8%)	49 (16,1%)
40	60 (19,8%)	03 (1%)	13 (4,3%)
≤ 80	90 (29,6%)	01 (0,4%)	02 (0,6%)
<b>Positivos</b>	214 (70,4%)	93 (30,6%)	146 (48%)
<b>Negativos</b>	90 (29,6%)	211 (69,4%)	158 (52%)
<b>TOTAL</b>	304	304	304

**Figura 5.** Títulos de anticorpos para os subtipos H3N8, H2N2 e H1N1

**Quadro 2.** Distribuição conjunta dos subtipos H3N8, H2N2 e H1N1

<b>TOTAL DE SOROS</b>	<b>H3N8</b>	<b>H2N2</b>	<b>H1N1</b>
<b>304</b>	<b>214 (70,39%) (+)</b>	<b>74 (24,34%) (+)</b>	<b>50 (16,45%) (+)</b>
			<b>24 (7,89%) (-)</b>
		<b>140 (46,05%) (-)</b>	<b>61 (20,07%) (+)</b>
			<b>79 (25,98%) (-)</b>
	<b>90 (29,61%) (-)</b>	<b>17 (5,59%) (+)</b>	<b>08 (2,63%) (+)</b>
			<b>09 (2,96%) (-)</b>
		<b>73 (24,02%) (-)</b>	<b>26 (8,56%) (+)</b>
			<b>47 (15,46%) (-)</b>



**Figura 6.** Distribuição conjunta dos subtipos H3N8, H2N2 e H1N1

## 7. DISCUSSÃO

Horimoto & Kawaoka (2001) sugeriram que todas as linhagens do vírus influenza encontradas em mamíferos originaram de um ancestral aviário e posteriormente se estabeleceram nas respectivas espécies animais. Atualmente diversos trabalhos sobre a evolução, epidemiologia e ecologia têm detectado outros hospedeiros do vírus influenza, incluindo os resultados mais recentes de infecção de espécies animais que se acreditavam refratárias ao vírus, abrindo novas possibilidades na cadeia epidemiológica desta virose (CLEAVELAND et al. 2006; GIESE et al. 2008; SONGSERM et al. 2006b).

Quando analisamos os dados obtidos com o presente estudo verificamos que 70,4% dos cães reagiram ao subtipo H3, 30,6% ao subtipo H2 e 48% ao subtipo H1, sugerindo a circulação desses agentes entre a população canina (Tabela 3 e Figura 5).

No estudo da circulação conjunta dos diferentes subtipos de vírus influenza verificou-se que apenas 15,46% dos cães não reagiram para nenhum dos subtipos testados e aqueles que reagiram apenas a um dos subtipos representam 26% do total das amostras analisadas (Quadro 2 e Figura 6). A análise desses dados evidencia a disseminação de diferentes subtipos do vírus influenza entre a população canina, demonstrando a capacidade adaptativa desse agente a novos hospedeiros.

Após a análise dos dados obtidos constatou-se claramente que entre os subtipos avaliados, o subtipo H3 apresenta maior prevalência entre a população canina do município do Rio de Janeiro. Os diferentes enfoques utilizados para a referida análise, circulação isolada e conjunta com outros subtipos, demonstram a superioridade na positividade observada por esse subtipo.

Quando confrontamos os resultados positivos frente aos 3 subtipos verificou-se que 70,4% dos cães desenvolveram anticorpos anti-H3, positividade superior aquela observada nos demais subtipos. Em outra análise, quando consideramos a circulação conjunta dos diferentes subtipos e avaliamos a positividade dos cães que reagiram apenas para o subtipo H1 e H2 verificamos positividade de 8,6% e 3%, valores inferiores aos obtidos com aqueles que reagiram somente ao subtipo H3 que apresentou 26% de positividade (Quadro 2 e Figura 6).

A intensidade da resposta imunológica foi outra variável que reforçou a importância do subtipo H3 entre os caninos. Os resultados obtidos nas maiores diluições 1:40 e 1:80, demonstraram que 19,8% e 29,6% dos soros reagiram para o subtipo H3N8, respectivamente e nessas mesmas diluições, dos 304 soros analisados frente ao subtipo H2 e H1 apenas 1% e 4,3% apresentaram título 1:40 e 0,4% e 0,6% atingiram diluição maior ou igual a 80, respectivamente (Tabela 3 e Figura 5).

Considerando os aspectos citados acima podemos sugerir que o subtipo H3 encontra-se mais difundido e adaptado à espécie canina quando comparado com os demais subtipos analisados a semelhança da circulação deste subtipo entre humanos. No entanto não podemos desconsiderar o fato de que esse subtipo circula entre os eqüinos desde 1963, sendo relacionado aos freqüentes surtos de gripe em diversas partes do mundo e foi considerado até 2005 como exclusivos dos eqüídeos.

O primeiro surto de influenza eqüina, subtipo H3N8, descrito no Brasil ocorreu em 1963, no Estado de São Paulo (ANDREWS et al., 1978). No Estado do Rio de Janeiro, foram descritos surtos de influenza eqüina em 1969, 1976, 1985 (CUNHA, 1970; CUNHA et al., 1978; CUNHA et al., 1986) e recentemente, foi relatado um surto de gripe que acometeu eqüinos vacinados (LOUREIRO, 2004) e, nos quatro episódios, o subtipo H3N8 esteve envolvido. Diversos estudos sorológicos (LOUREIRO et al., 2002, OLIVEIRA, 2005 e DIEL et al., 2006) evidenciam a circulação desse subtipo em diferentes regiões do Brasil. E no ano de 2005, pela primeira vez foi descrito nos Estados Unidos o isolamento do vírus influenza eqüina em cães (A/canine/Florida/43/2004). Análises moleculares e antigênicas identificaram a amostra como pertencente ao subtipo H3N8 (CRAWFORD et al., 2005).

Os surtos de influenza eqüina descritos acima e a soropositividade de 42,06%, 27%, 37,8% e 65,4% verificada nos inquéritos epidemiológicos realizados em eqüídeos frente o subtipo H3N8 (PAGANO et al., 1985; LOUREIRO et al., 2002; OLIVEIRA, 2005; DIEL et al., 2006) sugerem que o subtipo H3N8 encontra-se presente e circulante na população eqüina do Estado do Rio de Janeiro. Apesar de não existir relato de surto entre a população canina por esse subtipo no Brasil, o presente estudo identificou soropositividade em 70,4% dos cães testados.

Essas evidências destacam a posição dos eqüinos como um importante elo na cadeia epidemiológica desse subtipo e possível transmissor desse agente a espécie canina, a semelhança do ocorrido nos Estados Unidos quando o subtipo H3N8 rompeu a barreira interespecies e infectou diretamente os cães, ou ainda, na possibilidade de infecção do humano pelo subtipo eqüino e posterior transmissão aos caninos (CRAWFORD et al. 2006).

Infecções experimentais com o vírus influenza eqüina foram realizadas em humanos e demonstraram que o homem não desenvolve a doença quando exposto ao vírus, no entanto foi possível realizar o isolamento viral e detectar a presença de anticorpos nos pacientes infectados (KASEL et al. 1965 *apud* MOIRIGNOT, 1977). Posteriormente descobriu-se que os anticorpos produzidos contra o vírus da influenza equina conferiam uma certa imunidade contra o vírus humano, sugerindo a existência de uma possível reação cruzada entre ambos (COUGH & DOUGLAS 1969 *apud* MOIRIGNOT, 1977).

Alexander & Brown (2000) destacaram a possibilidade de infecção humana pelo subtipo H3N8, foram observadas infecções eventuais e subclínicas em pessoas que manipulavam esse vírus em laboratório, representando um potencial risco biológico para esses trabalhadores.

Mancini e colaboradores (2004) realizaram um levantamento sorológico em eqüinos, confrontando cepas específicas (eqüino) e não específicas (humana) deste vírus. Os resultados demonstraram à alta positividade à cepa não específica quando comparada àquela específica. Como o tipo B, deste vírus, é restrito à espécie humana, a positividade observada nos eqüinos sugere uma direta transmissão interespecies, como a observada nas viroses zoonóticas. Surge dessa forma uma lacuna que permite questionar a origem desse subtipo que pela primeira vez é identificada sorologicamente sua circulação entre a população canina.

Na oportunidade, ressaltamos que o subtipo H3 está classificado como o subtipo de maior circulação entre a população brasileira, segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) a influenza humana está caracterizada por três subtipos de hemaglutinina imunologicamente distintos (H1, H2 e H3) e duas neuraminidases (N1 e N2). Os subtipos H1 e H3 vêm sendo identificados com freqüência entre a população humana. No período de 2000 a 2008 ambos os subtipos circularam entre a população humana no

Brasil, no entanto cepas do subtipo H3 foram identificadas como de maior circulação entre humanos.

Os dados apresentados acima sobre a circulação predominante do subtipo H3 entre humanos e o envolvimento desse subtipo nos últimos surtos de influenza humana atentam para possibilidade da transmissão homem-cão principalmente se considerarmos que a homologia existente entre o mesmo subtipo de hemaglutinina.

A homologia é maior que 90% entre as H de um mesmo subtipo, ou seja, a H3 de eqüinos, cães e humanos podem ser semelhantes entre si, de tal forma que, a homologia entre o mesmo subtipo de H pode causar reação cruzada entre os anticorpos de diferentes tipos de vírus, isso fica visível através da avaliação sorológica que permite avaliar a positividade frente à H3, mas não permite tipificação viral (COUCH & KASEL, 1995)

Comparando os resultados obtidos no presente estudo, onde foram observadas positividade de 70,4% frente ao subtipo H3 com outros estudos sorológicos realizados em cães é possível observar que valores superiores foram encontrados, no entanto é importante ressaltar que a alta prevalência nesses estudos esteve sempre associada a ocorrência de surtos de influenza.

Em 2002 estudo realizado em cães da raça quarry hounds no Reino Unido apresentou uma positividade menor (37,5%) de cães, no entanto a soroprevalência foi de 0% em cães nascidos após 1 de abril de 2003 e 90% em cães nascidos antes de 1 de novembro de 2002. Curiosamente, o período de maior prevalência coincidiu com o momento em que foram descritos surtos e o subtipo H3N8 estava circulando na população eqüina (NEWTON et al., 2007). Se considerarmos o período anterior a ocorrência do referido surto (cães nascido após 1/04/2003) veremos que não houve indício de circulação viral entre a população examinada, achado contrastante com o presente estudo que identificou elevada soropositividade (70,4%) em um período onde oficialmente não havia registro de surto de influenza em cães na cidade do Rio de Janeiro.

Passados três meses do surto de influenza na Flórida (2004) análise realizada em 73 cães evidenciou 93% de soropositividade, incluindo animais doentes e cães sadios que tiveram contato com os enfermos. Ressaltando, novamente a relação entre a elevada taxa de prevalência e a

ocorrência dos surtos que se desencadearam em vários estados americanos (CRAWFORD et al., 2005).

Na oportunidade, relembremos que os dados do presente estudo embora menores que os discutidos acima não se remetem a um período de ocorrência de surto de influenza em eqüinos ou nos cães, fato que justificaria os valores inferiores de positividade detectados. Outra possibilidade que poderia ser considerada para justificar o elevado índice de soropositividade (70,4%) seria a ocorrência de episódios da doença em cães na cidade do Rio de Janeiro que não estariam sendo identificados pelos médicos veterinários e pesquisadores.

Essa hipótese é altamente plausível uma vez que os sintomas e achados apresentados pelos cães infectados não são específicos, podem ocorrer de forma branda e se assemelham a outras enfermidades causadas por agentes que acometem os cães e cursam sob a forma de surtos respiratórios, tais como: Pneumonias bacterianas, Parainfluenza (Parainfluenza canina), Complexo da tosse dos canis (*Bordetella bronchiseptica*, vírus da Parainfluenza canina, Adenovírus canino do tipo 1 e 2, Herpesvírus canino, Reovírus canino do tipo 1, 2 e 3, Micoplasmas e Ureaplasmas), Cinomose (Paramyxovírus), Erlichiose (*Ehrlichia canis*) e outras (FORD & VADEN, 1990). Essas características podem estar dificultando o diagnóstico da influenza canina e impossibilitando a identificação e descrição da doença em cães no Brasil. Com base nos resultados obtidos e nas considerações levantadas podemos sugerir que casos de influenza canina podem estar ocorrendo com frequência e sendo subdiagnosticados.

Outro enfoque totalmente diferente pode ser atribuído aos resultados do presente estudo se for considerada a modificação na técnica de HI sugerida por Crawford, Karacas e seus colaboradores (2008) quando observaram que a utilização de hemácias de perus em substituição as de galinha resultavam em títulos de inibição da hemaglutinação quatro vezes maiores frente o subtipo H3. Desta forma, os títulos encontrados no presente estudo poderiam ser maiores e mais importante, amostras consideradas negativas (títulos >10) no presente estudo se submetidas à avaliação frente à suspensão de hemácia de perus poderiam ser consideradas positivas, elevando ainda mais a porcentagem de animais soropositivos.

Nessa situação teríamos uma soropositividade maior que 70,4% que poderia se aproximar ou até mesmo igualar aos valores obtidos em estudos sorológicos realizados nos períodos de surtos descritos nos Estados Unidos. Reforçando a hipótese de ocorrência de episódios da doença em cães na cidade do Rio de Janeiro que não estariam sendo descritos e identificados pelos médicos veterinários e pesquisadores

Durante um surto de influenza eqüina na Austrália, no final de 2007, foi observado que cães que mantinham contato com eqüídeos apresentaram sintomas respiratórios compatíveis com influenza. Na oportunidade foram coletados sangue desses animais com sintomas, cães que mantiveram contato com eqüinos e cães cujos proprietários estavam trabalhando com cavalos. Do total de 40 soros coletados, 23 (57,5%) apresentaram positividade na prova de HI e ELISA frente o subtipo eqüino H3N8 (A/equine/Sydney/2007)(KIRKLAND et al., 2010). Valor inferior de positividade quando comparado com o presente estudo e com outros realizados nos Estados Unidos durante a onda de surtos de influenza canina.

No entanto, é importante destacar que quando as amostras (H3N8) isoladas dos eqüinos e cães foram comparados com outras seqüências do subtipo H3N8 no GenBank, ficou evidenciado que a seqüências de nucleotídeos que codificam as proteínas de superfície (H e N) e da proteína M das amostras caninas eram semelhantes às estirpes A/equine/Kanazawa/1/2007 e A/equine/Ibaraki/1/2007 isoladas durante o surto de influenza ocorrido em 2007 que acometeu eqüinos no Japão (KIRKLAND et al., 2010).

Análises filogenéticas concluíram que as amostras isoladas de cães na Austrália não apresentaram as mudanças de nucleótidos que foram identificadas no vírus da influenza canina nos Estados Unidos, sugerindo a existência de 2 linhagens distintas, além disso, durante o surto na Austrália não ficou comprovada a transmissão horizontal do vírus da influenza entre os cães. Esses fatores nos levam a compreender o porquê da baixa soropositividade encontrada em cães na Austrália.

No entanto, quando confrontamos os resultados do presente estudo com pesquisas sorológicas realizadas fora do período de ocorrência de surtos de influenza canina verificamos que a soropositividade é superior, contrastando com as análises anteriores. Após o isolamento, em 2004, do vírus

influenza eqüina em cães (A/canine/Florida/43/2004) pesquisadores iniciaram um trabalho de reavaliação de amostras referente a episódios de doença respiratória que na ocasião foi impossibilitado o diagnóstico e estavam armazenadas. Inicialmente foram avaliadas 33 amostras caninas referente aos anos 1996 a 1998 e os resultados evidenciaram ausência de soropositividade frente ao subtipo H3N8(A/canine/Florida/43/2004). Posteriormente 32 amostras foram submetidas a avaliação sorológica frente ao mesmo subtipo e apenas 9 (28%) reagiram positivamente (CRAWFORD et al., 2005).

Kruth e colaboradores (2008) realizaram um estudo transversal utilizando uma amostragem de conveniência a partir de 9 consultórios veterinários em Ontário. Na oportunidade, foram coletadas amostras de 225 cães entre 15 de janeiro e 20 de junho de 2006. Anticorpos contra o vírus da gripe canina foram detectados em apenas 1 (0,4%) cão. O cão soropositivo estava clinicamente normal, não apresentava história recente de doença do trato respiratório e coincidentemente era originário de um centro de corrida na Flórida

Esses achados reforçam novamente a possibilidade da ocorrência de episódios da doença em cães na cidade do Rio de Janeiro e a importância dos caninos na cadeia epidemiológica da doença.

Com relação ao subtipo H1N1, do total de 304 soros analisados pela prova de HI, 146 apresentaram reatividade com títulos entre 10 e  $\geq 80$ , representando um pouco menos da metade da população investigada. Quando comparamos os resultados obtidos frente H3 (70,4%) verificamos um percentual menor de cães reagindo ao H1, obedecendo o mesmo perfil epidemiológico da circulação do vírus influenza observada entre os humanos nos anos de 2000 a 2008, fortalecendo novamente a suposição de correlação entre a circulação desses subtipos entre homem e cães.

Considerando os dados apresentados acima acerca da vigilância nacional de influenza nos últimos anos, podemos verificar que o subtipo H1 vem sendo identificado com frequência entre a população brasileira e por essa razão está incluído juntamente com o subtipo H3 e amostra do vírus influenza B na formulação das vacinas antiinfluenza humana disponíveis atualmente (SVS, 2005a).

O subtipo H1 que se encontra difundido entre a população humana, esteve envolvido na maior pandemia da história, a gripe espanhola,

acometendo cerca de metade da população mundial (NETO, 2001) e atualmente uma amostra recombinante (A/Califórnia/04/2009) deste mesmo subtipo desencadeou a mais recente pandemia de influenza. O grande número de casos diagnosticados no mundo levou a OMS a elevar o nível de alerta do vírus H1N1 para fase 6 em menos de dois meses da data do primeiro caso e as proporções só não foram maiores devido a baixa taxa de letalidade (WHO, 2009b; FAO, 2009).

O ano de 2009 foi marcado pela mudança no perfil de circulação do vírus influenza, diferente do observado nos anos anteriores, a partir de abril uma nova variante do vírus influenza A, subtipo H1N1 infectou humanos em diversas partes do mundo e superou a proporção de casos de influenza sazonal (WHO, 2009b; FAO, 2009; SVS; 2009).

No Brasil, até a semana epidemiológica 47, foram confirmados 30.055 casos de SRAG (Síndrome Respiratória Aguda) por algum vírus influenza, sendo que a proporção de influenza pandêmica foi de 93% (27.850/30.055) e de influenza sazonal de apenas 7% (2.205/30.055). Padrão similar ao observado pela Rede Global de Vigilância da Influenza da OMS, que registrou 93% de influenza pandêmica entre todos os vírus de influenza monitorados no mundo, evidenciando a substituição das amostras sazonais pela pandêmica (SVS, 2009).

Destacamos que nos episódios relatados acima houve o envolvimento do vírus da influenza suína. Taubenberger e colaboradores (1997) através de estudos filogenéticos demonstraram que o vírus pandêmico de 1918 apresentava relações genômicas com o vírus da influenza suína H1N1 oriundo de um ancestral aviário e a amostra de 2009 (A/Califórnia/04/2009) tratava-se de uma recombinação de quatro diferentes estirpes de vírus influenza, duas de origem suína que não havia sido detectada previamente em humanos ou suínos (WHO, 2009b; FAO, 2009).

O subtipo H1N1 está relacionado como um dos principais causadores da influenza suína clássica, enfermidade altamente contagiosa que acomete suídeos na América, Europa, África e Ásia (FAO, 2009). Trabalhos realizados no Brasil identificaram a circulação deste agente em diversos municípios do Estado do Rio de Janeiro e nas grandes regiões produtoras de suínos no Estado de Mato Grosso do Sul e demonstraram que as taxas de ocorrência de anticorpos para o vírus da Influenza foram proporcionais as

densidades demográficas de suínos e humanos bem como ao afluxo de pessoas em cada uma dessas regiões estudadas (MOTA et al. 2002; OLIVEIRA JUNIOR, 2004).

Ressaltamos que os suínos desempenham um papel importante na cadeia epidemiológica da influenza, atuando como hospedeiros intermediários se infectam por vírus de origem aviária, eqüina e/ou humana e originam novos subtipos através de rearranjos genéticos (HINSHAW et al. 1981; KIDA et al. 1994). A complexidade desta cadeia epidemiológica sugere que amostras suínas podem estar infectando humanos ou vice-versa e por sua vez os caninos ou amostras suínas podem estar infectando diretamente os cães.

O subtipo H2 foi o que apresentou menor reatividade (30,6%) entre os cães e desde 1968 não há registro de surtos ou epidemias sendo causadas por esse subtipo em humanos. No entanto essa positividade deve ser considerada de modo que a vigilância desse subtipo em humanos no Brasil seja estimulada, evitando que o gerenciamento de risco desse agente seja subestimado, não seria seguro considerar que esse agente não esteja circulando na população humana baseado apenas nas análises de amostras identificadas em surtos. A reemergência de surtos desse subtipo representaria uma grande ameaça à população humana, uma vez que amostras desse subtipo foram retiradas das formulações das vacinas antiinfluenza utilizadas atualmente e somente àqueles nascidos antes de 68 teriam anticorpos anti-H2N2.

Os argumentos acima alertam para possibilidade da reemergência de surtos envolvendo o subtipo H2, assim como a ocorrência de rearranjos genéticos deste subtipo, circulante em cães, com outros subtipos do vírus influenza originando uma nova variante ainda não identificada na espécie humana, a semelhança do que ocorreu em 1957 e 1968 nas pandemias conhecidas como Gripe Asiática e de Hong Kong (WEBSTER et al. 1992; PYLE 1986; POTTER, 1998).

Um aspecto importante que merece ser destacado e que reforça a possibilidade de transmissão homem-cão deve-se ao fato que os cães objeto do presente estudo são oriundos da Zona Oeste do Estado do Rio de Janeiro, mais especificamente do bairro da Barra da Tijuca, que concentra população de classe média alta. A maioria desses cães possui um alto valor comercial,

usufruem de alimentação de qualidade, assistência Médico-Veterinária periódica e todos os cuidados básicos que garantem o bem estar dos mesmos.

São animais mantidos em estrito contato com o homem, a grande maioria vive em apartamentos e condomínios, sem contato com outras espécies animais como suínos, eqüinos e/ou aves, são exemplos clássicos do processo de humanização o qual vem sendo submetidos os animais domésticos. Essas características sócio-culturais que envolvem os proprietários e conseqüentemente seus animais e o estreito relacionamento entre ambos reforçam a possibilidade da transmissão homem-cão-homem.

A relação homem-animal está cada vez mais estreita, principalmente entre crianças e idosos. Ter um animal de estimação não é apenas uma questão de lazer ou de companhia. A medicina está descobrindo que eles também podem ser benéficos para a saúde humana, um exemplo claro é o crescimento da procura pela terapia assistida com animais (TAA), que consiste em visitas programadas com animais devidamente treinados para o contato com pessoas estranhas, principalmente idosas, crianças e deficientes físicos e mentais.

Em termos psicológicos, os cães, estão sendo utilizados com freqüência em terapias para equilibrar emoções em casos de perdas, luto, depressão, desilusões e outros. Uma interação que vem crescendo espantosamente nos últimos anos é o convívio dos idosos com os cães, esses animais surgem como verdadeiros companheiros que aliviam os dias de solidão dessas pessoas (KASSIS, 2002).

De acordo com a Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação, a ANFAL Pet, o Brasil tem 32 milhões de cães e 16 milhões de gatos. Acredita-se que seja a segunda maior população no planeta, inferior apenas à existente nos Estados Unidos, nos últimos 15 anos, o número de cães quase triplicou no Brasil (ANFAL PET, 2009)

Uma pesquisa realizada entre março e abril de 2008 em oito metrópoles brasileiras, forneceu uma visão da intimidade dos brasileiros com seus cães e gatos e demonstrou que estão presentes em 44% dos lares das classes A, B e C, nesses lares 23% dos cães dormem nos quartos de seus donos, nas residências da classe A, são 35%. Em lugares como Porto Alegre, Curitiba e Campinas os cães já circulam em mais da metade das casas

(COMAC, 2008)

Com o crescimento da população canina e a relação cada vez mais estreita entre homem-animal e a acelerada transição demográfica e epidemiológica observada no Brasil, onde os idosos representam o segmento populacional que mais cresce em termos relativos e o número crescente de imunodeprimidos (IBGE, 2000). Torna-se cada vez mais necessária a ação conjunta do Ministério da Saúde com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, buscando uma maior integração entre a vigilância da influenza humana e animal.

Torna-se importante ressaltar que os patógenos zoonóticos são responsáveis por 75% das doenças infecciosas emergentes em seres humanos e que atualmente o grande desafio global está focado na vigilância de patógenos zoonóticos nos organismos animais devido à complexa cadeia de transmissão que envolve os hospedeiros intermediários e na utilização de uma nova abordagem, considerando a ecologia da fauna / manutenção do patógeno e as interações na interface humano-animal. No entanto, grande parte do empenho e incentivo científico e financeiro tem-se centrado sobre correções antropocêntricas, em vez da compreensão e direcionamento aos segmentos potencialmente vulneráveis ao processo e que conduzem ao aparecimento de doenças humanas (CHILDS & GORDON, 2009).

Destaca-se a necessidade da mudança no perfil dos sistemas de vigilância implantados pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças que enfatizam principalmente os humanos, surge a necessidade de se estreitar a vigilância nos animais silvestres e domésticos, principalmente com relação àqueles que possuem estrito contato com o homem (CHILDS & GORDON, 2009).

Nesse contexto, destaca-se a influenza, enfermidade classificada como uma zoonose, infecção adquirida pelos animais a partir do reservatório humano, com grande potencial para causar doenças em populações de animais selvagens e domésticos gerando custos substanciais para as economias nacionais e globais, com perdas no comércio e turismo e aumento dos custos públicos de saúde (EPSTEIN & PRICE, 2009).

Os patógenos zoonóticos são comumente relatados em animais de cativeiro ou animais domésticos com estreito contato humano, representando risco potencial de reinfecção dos humanos. Além disso, existe o

potencial de infecção em populações de animais selvagens, comprometendo a manutenção de espécies ameaçadas e a diminuição da biodiversidade. A emergência ou reemergência de patógenos humanos primários no ciclo selvagem pode originar, por recombinações, variantes antigênicas gerando conseqüências desastrosas para a saúde humana quando infectado por esta nova estirpe (EPSTEIN & PRICE, 2009).

Investigações sugerem a possibilidade de que os suínos foram inicialmente infectados com a cepa H1N1 da pandemia de 1918 de origem humana após a primeira onda de infecção que ocorreu nos Estados Unidos em 1918, o subtipo se estabeleceu entre os suínos e desde então vem sendo identificado entre os suínos em diversas partes do mundo. (EPSTEIN & PRICE, 2009).

Caso semelhante ocorreu em 2009, no Canadá, durante a pandemia de H1N1 quando foi notificado surto envolvendo suínos infectados pela amostra pandêmica e observou-se que um dos trabalhadores da fazenda, havia viajado recentemente ao México, voltou doente e pode ter introduzido o vírus H1N1 para o rebanho suíno daquela região (EPSTEIN & PRICE, 2009; FAO, 2009).

Globalmente, as regiões com alta biodiversidade, densidade de população humana, e altos níveis de interação entre humanos e animais são consideradas mais vulneráveis ao aparecimento de patógenos zoonóticos e zoonotrópicos. Como a taxa de doenças infecciosas emergentes (em humanos e animais) tende a aumentar com o crescimento das pressões antrópicas, torna-se indispensável uma melhor compreensão do complexo de troca multidirecional de patógenos entre os seres humanos, animais selvagens e domésticos animais, a fim de garantir a sanidade da população humana, animal e do ecossistema (DASZAK et al., 2000; EPSTEIN & PRICE, 2009)

Ao sugerirmos o possível elo de transmissão homem-cão-homem, consideramos a importância que esses animais poderiam exercer frente uma pandemia de influenza humana. A cadeia epidemiológica do vírus influenza se destaca principalmente por sua complexidade e cada vez que inserimos um novo hospedeiro a ela estamos aumentando as possibilidades de rearranjos e o surgimento de novas variantes, nesse contexto, o rompimento da barreira interespecie representa apenas uma questão de tempo.

Apesar dos indícios, ainda não foi possível identificar a transmissão do vírus da influenza canina aos humanos, ou vice-versa, no entanto tal hipótese é teoricamente possível, existem comprovações científicas de que a ausência de receptores específicos não representa uma barreira à transmissão interespecie, um exemplo clássico e recente foi a infecção de humanos pelo subtipo aviário H5N1 que tem predileção por receptores do tipo acetilneuroamínico- $\alpha$ 2,3-galactos e infectou humanos em diversas partes do mundo (JANET, 2006).

Os resultados do presente estudo evidenciam a disseminação de diferentes subtipos do vírus influenza entre a população canina, demonstrando a capacidade adaptativa desse agente a novos hospedeiros. Nesse cenário, os médicos veterinários representam peças fundamentais em caso de surtos da doença, na sua prevenção e controle. Esses profissionais precisam ser alertados da real possibilidade de se depararem com casos de influenza e estar preparados para conduzir o diagnóstico e adoção de medidas de biossegurança, isolamento e controle, evitando a disseminação do vírus à população canina.

Destacamos que em janeiro de 2006, o resultado de pesquisa sorológica indicava a presença do vírus da influenza canina (canine/CO/06) na região do Colorado e em dezembro do mesmo ano foi descrito um surto de gripe em canis e abrigos de Denver (DUBOVI & NJAA, 2008). Esse episódio reforça a importância da vigilância e do monitoramento da influenza, através da avaliação sorológica, pois permite reunir informações indispensáveis para conhecer, a qualquer momento, o comportamento ou a história natural das doenças, bem como detectar ou prever alterações de seus fatores condicionantes, com a finalidade de recomendar oportunamente, sobre bases firmes, as medidas eficientes à prevenção dos possíveis surtos da doença, permitindo um melhor gerenciamento de risco e evitando consequências desastrosas.

Os resultados apresentados pelo presente estudo, a complexidade da cadeia epidemiológica do vírus influenza e o fato de que algumas das doenças infecciosas emergentes no homem são provenientes de reservatórios animais, reforçam a necessidade do estabelecimento de uma rotina diagnóstica e epidemiológica mais aprofundada que permita traçar a real situação da circulação do vírus influenza A em cães nas diferentes regiões do Brasil,

promovendo de forma racional o gerenciamento de risco desta virose e alertando as autoridades sanitárias responsáveis sobre o risco de possíveis surtos de influenza entre os cães e o impacto que poderá acarretar a população humana mundial.

## 8. CONCLUSÕES

8.1 - O vírus influenza, subtipos H1, H2 e H3, encontram-se presentes e circulantes na população canina do Estado do Rio de Janeiro.

8.2 - O percentual de animais soropositivos frente ao subtipo H3 foi maior quando comparado aos demais subtipos.

8.3 - Apenas uma pequena parcela da população testada (15,5%) não reagiu frente os subtipos (H1, H2 e H3) do vírus influenza.

8.4 - Resultados de soropositividade frente ao subtipo H3 (70,6%) obtidos pelo presente estudo são inferiores aos observados durante os surtos de influenza em cães nos Estados Unidos e superiores aos obtidos fora do período de episódio da doença.

8.5 - O perfil de circulação dos subtipos H1, H2 e H3 do vírus influenza em cães se assemelha à circulação desses em humanos, reforçando a necessidade de contínua vigilância na população canina, indicando uma possível ligação entre espécies na cadeia epidemiológica.

## 9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABRAMSON, J. S et al. A Influenza A virus-induced polymorphonuclear leuckocyte dysfunction. **Infect. Immun.**, v. 37, p. 794-799, 1982.

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. **Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales**. 3. ed. Washington: Organización Panamericana de la Salud., 2003. p. 329-345.

ALEXANDER D. J. A reviw e of avian influenza in different bird species. **Vet. Microbiol.**, v. 74, n. 1-2, p. 3-13, 2000.

ALEXANDER D. J.; BROWN, I. H. Recent zoonoses caused by influenza A viruses. **Rev. sci. tech. Off. Int. Epiz.**, v. 19, p. 197–225, 2000.

AMONSIN, A et al. Genetic analysis of influenza A virus (H5N1) derived from domestic cat and dog in Thailand. **Arch. Virol.**, v. 152, n. 10, p. 1925-1933, 2007.

ANDRADE, C. M. **Meios e soluções comumente empregados em laboratórios**. 1. ed. Rio de Janeiro: Universidade Rural, 2000. p.10.

ANDREWS, C.; PEREIRA, H. G.; WILDY, P. **Viruses of vertebrates**. 4th ed. London: Ballière Tindall, 1978. 42p.

ANFAL PET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação/Evalis do Brasil e APPA – American Pet Products Association. 2009. Disponível em: [www.Anfalpet.org.br](http://www.Anfalpet.org.br). Acesso em: 09 jan. 2010.

BALOWS, A.; HAUSLER JR, W. J.; HERMMANN, K. L. **Manual of clinical microbiology**. 5th ed. Washington: 1996. p. 874.

BEAN, W. J. et al. Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and non human hosts. **J. Virol.**, v. 66, n. 2, p. 1129-1138, 1992.

BERZINS, M. A. V. S. **Velhos, cães e gatos: interpretação de uma relação**. São Paulo: PUC, 2000. Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica, Pós-graduação em Gerontologia.

BETAKOVA, T.; NERMUT, M. V.; HAY, A. J. The NB protein is an integral component of the membrane of influenza B virus. **J. Gen. Virol.**, v. 77, p. 2689-2694, 1996.

BOSSART-WHITAKER, P. et al. Threedimensional structure of influenza A N9 neuroaminidase and its complex with the inhibitory 2-deoxy 2,3-dehydro-N-acetyl neuraminic acid. **J. Molec. Biol.**, v. 232, p. 1069-1083, 1993.

BRASIL. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Decreto-Lei nº 467, de 13 de fevereiro de 1969. Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabriquem e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 fev. 1969. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. Acesso em: 11 out. 2008.

\_\_\_\_\_ Congresso Nacional. Lei Orgânica da Saúde nº 8080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 20 set. 1990. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 11 out. 2008.

\_\_\_\_\_ Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 301, de 19 de abril de 1996. Aprova as normas complementares anexas, elaboradas pela Secretaria de Defesa Agropecuária, a serem observadas pelos estabelecimentos que fabriquem e ou comerciem produtos de uso veterinário. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 25 abr. 1996. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta>. Acesso em: 11 out. 2008.

————— Ministério da Saúde. Portaria Conjunta ANVISA / FUNASA n° 01, de 02 de agosto de 2000. Dispõe sobre as exigências para o funcionamento de estabelecimentos privados de vacinação, seu licenciamento, fiscalização e controle, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 ago. 2000. Disponível em: <http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 11 out. 2008.

————— Ministério da Saúde-Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa Nacional de Imunizações – 30 anos**. Série C. Projeto, Programas e Relatórios. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 212 p.

————— Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Plano de contingência pra influenza aviária e doença de Newcastle**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 11 out. 2008.

BRASSARD, D. L.; LESER, G. P.; LAMB, R. A. Influenza B virus NB glycoprotein is a component of the virion. **Virology**, v. 220, p. 350-360, 1996.

BRENTANO, L. et al. Levantamento soropidemiológico para coronavírus respiratório e da gastroenterite transmissível e dos vírus de influenza H3N2 E H1N1 em rebanhos suínos no Brasil. **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Comunicado técnico, n. 306, 2002.

BRENTANO, L.; BERTANI, G.; AZEVEDO JUNIOR, S. Impacto da influenza aviária na avicultura e saúde humana. In: SIMPÓSIO GOIANO DE AVICULTURA E SUINOCULTURA. 2005, goiânia. Disponível em: [http://www.cnpa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_h9z87i9x.pdf](http://www.cnpa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_h9z87i9x.pdf). Acesso em 27 ago. 2009.

BRITO, N. A. La dansarina: A gripe espanhola e o cotidiano na cidade do Rio de Janeiro. **História, Ciência, Saúde- Manguinhos**, v. 4, n. 1, p. 11-30, 1997.

BROWN, I. H. Recent changes in the epizootiology of swine Influenza. **Pig Journal.**, v. 36, p. 150-157, 1996.

BROWN, I. H. et al. Genetic characterization of an influenza A virus of unusual subtype (H1N7) isolated from pigs in England. **Arch. Virol.**, v. 142, p. 1045–1050, 1997.

BROWN, E. G. Influenza vírus genetics. **Biomed. Pharmacother.**, v. 54, n. 4, p. 196-209, 2000.

BUKRINSKAYA, A. G. et al. Influenza virus uncoating in infected cells and effect of rimantadina. **J. Gen. Virol.**, v. 60, p. 49-59, 1982.

BUTT, K. M. et al. Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5760-5767, 2005.

CAPUA, I.; ALEXANDER, D.J. Avian Influenza: Recent developments. **Avian Pathol.**, v. 4, p. 393-404, 2004.

CASTLEMAN, W. L. et al. Canine H3N8 Influenza Virus Infection in Dogs and Mice. **Vet. Pathol.**, 2010.

CASTRUCCI, M. R. et al. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. **Virology**, v. 193, p. 503–506, 1993.

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention and control of Influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly Report 50 (RR-4)**: pp.1-44. 2001.

\_\_\_\_\_ Prevention and Control of Influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). **Morbidity and Mortality Weekly**. 2002.

CENTER FOR FOOD SECURITY & PUBLIC HEALTH. College of Veterinary Medicine, Iowa State University. **Canine influenza**, 2009. Disponível em: [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/canine\\_influenza.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/canine_influenza.pdf). Acesso em: 7 maio, 2009.

CHAMBERS, T. M. et al. Rapid diagnosis of equine influenza by the directigen Flu-A enzyme immunoassay. **Vet. Record**, v. 135, p. 275-279, 1994.

CHEN, Z. et al. Enhanced protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with both hemagglutinin and neuroaminidase-expressing DNAs. **Vaccine**, v. 17, p. 653-659, 1999.

CHEN, Z.; KRUG, R.M. Selective nuclear export of viral mRNAs in influenza-virus-infected cells. **Trends Microbiol.**, v. 8, n. 8, p. 376-383, 2000.

CHILDS, J. E.; GORDON, E. R. Surveillance and control of zoonotic agents prior to disease detection in humans. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 76, p: 421–428, 2009.

CLEAVELAND, S.; MESLIN, F. X.; BREIMAN, R. Dogs can play role as sentinel hosts for disease. **Nature**, v. 440, p. 605, 2006.

COMAC – Comissão Animais de Companhia/SINDAN. Pesquisa Radar Pet. 2008. Disponível em: <http://www.comacvet.org.br/comac/noticias.aspx?id=80>. Acesso em: 10 nov. 2009.

CONG, Y. L. et al. Antigenic and genetic characterization of H9N2 swine influenza viruses in China. **J Gen Virol.**, v. 88, p. 2035-2041, 2007.

COUCEIRO, J. N. S. S. 1986. **Estudo da ocorrência de infecções por vírus influenza A e vírus da Doença de Newcastle numa comunidade de aves ornamentais em cativeiro**. Rio de Janeiro: UFRJ, 1986. 126f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Rio de Janeiro.

COUCEIRO, J. N. S. S.; COUCEIRO, E.S.; MACHADO, R. D. Circulação simultânea de Myxovírus e Paramyxovírus numa comunidade aviária ornamental. **Rev. Microbiol.**, v.18, n. 4, p. 375 - 379, 1987

COUCH, R. B.; KASEL, J. A. Influenza. In: LENNETTE, E. H. et al. **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and chlamydial Infections**. 7th ed. Washington: American Public Health Association, 1995, p. 431-446.

COX, N. J.; FUKUDA, K. Influenza. **Infec. Dis. Clin. Nort Am.**, v. 12, n. 1, p. 27-38, 1998.

COX, N. J.; SUBBARAO, K. Influenza. **Lancet**, v. 354, p. 1277-1282, 1999.

CRAWFORD, P. C. et al. Transmission of equine influenza vírus to dogs. **Science**, v. 310, n. 5747, p. 482-485, 2005.

CRAWFORD, P. C. **Canine influenza: epidemiology, clinical disease, diagnosis, treatment, and prevention**. International Society for Companion Animal Infectious Diseases. 2009. Disponível em: [http://www.iscaid.org/assets/content/documents/Crawford\\_Influenza\\_Review\\_July09.pdf](http://www.iscaid.org/assets/content/documents/Crawford_Influenza_Review_July09.pdf). Acesso em: 10 ago. 2009.

CROSBY, W. **America's forgotten pandemic: the influenza of 1918**. 1th. Cambridge: 1989, p. 205-207.

CUNHA, R. G. Isolamento do vírus de influenza A/equi 2 no Estado da Guanabara. **Rev. Bras. Biol.**, v. 30, n. 4, p. 491-498, 1970.

CUNHA, R. G.; PASSOS, W. S.; VALLE, M. C. C. Surto de gripe equina produzido por vírus de influenza A/equi 2 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 38, n. 3, p. 549-554, 1978.

CUNHA, R. G. et al. Surto de gripe equina produzido por vírus de influenza A/equi 1 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Biol.**, v. 8, n. 3, p. 88-91, 1986.

DALY, J. M. et al. Transmission of equine influenza virus to English Foxhounds. **Emerg. Infect. Dis.**, v.14, n. 3, p. 461-464, 2008.

DASZAK, P. et al. Emerging infectious diseases of wildlife—threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, p: 443–449, 2000.

DESHPANDE, M. S. et al. Evaluation of the efficacy of a canine influenza virus (H3N8) vaccine in dogs following experimental challenge. **Vet. Ther.**, v. 10, n. 3, p. 103-112, 2009.

DESSELBERGER, U. et al. The 3'-and 5'- terminal sequences of influenza A, B and C viruses are highly conserved and show partial inverted complementarity. **Gene**, v. 8, p. 315-328, 1980.

DIEL, D. G. et al. Prevalence of antibodies to influenza virus, viral arteritis and herpesvirus in horses of the Rio Grande do Sul state, Brazil. **Cienc. Rural**, v. 36, n. 5, 2006.

DONE, S. H.; BROWN, I. H. Swine influenza in the United Kingdom, past and present. **Large Anim. Pract.**, v. 2, p. 20–28, 1997.

DUBOVI, E. J.; NJAA, B. L. Canine influenza. **Vet. Clin. Small Anim.**, v. 38, p. 827-835, 2008

EASTERDAY, B. C.; VAN REEYH, K. Swine Influenza, In: **Disease of swine**, USA: Iowa State University Press, Ames, 1990, p. 277-290.

EASTERDAY, B. C. et al. **Diseases of poultry**. Estados Unidos: Iowa State university Press, Ames, 1997, p. 583-605.

ENDO, A. et al. Evolutionary pattern of the H3 haemagglutinin of equine influenza viruses: multiple evolutionary lineages and frozen replication. **Archiv. Virol.**, v. 123, p. 73-87, 1992.

EPSTEIN, J. H.; PRICE, J. T. The significant but understudied impact of pathogen transmission from humans to animals. **Mount Sinai Journal of Medicine**, v. 76, p: 448–455, 2009

FAO - Food and Agriculture Organization. **FAO Guidelines for Surveillance of Pandemic H1N1/2009 and other virus in swine populations**. 2009, 19p. Disponível em: [http://www.fao.org/AG/AGAInfo/programmes/en/empres/AH1N1/docs/h1n1\\_guidelines\\_fao.pdf](http://www.fao.org/AG/AGAInfo/programmes/en/empres/AH1N1/docs/h1n1_guidelines_fao.pdf). Acesso em: 10 nov. 2009

FIELDS, B. N. et al. **Virology**. 2th ed. New York: Raven Press, 1990, 1064 p.

FORD, R. B.; VADEN, S. L. Canine Infectious Tracheobronchitis. In: Greene C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. Estados Unidos: W. B. Saunders Company. 1990, 971p.

FORLEO-NETO, E. et al. Influenza. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, n. 2, p. 267-274, 2003.

FOUCHIER, R. A. M. et al. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. **Proc Natl Acad Sci.**, v.101, p. 1356–1361, 2004.

————— Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. **J. Virol.**, v. 79, n. 5, p. 2814-2822, 2005.

FRANCE, A. M. et al. Modified M2 proteins produce heterotypic immunity against influenza A virus. **Vaccine**, v. 17, p. 2237-2241, 1999.

GIESE, M. et al. Experimental infection and natural contact exposure of dogs with avian influenza virus (H5N1). **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 2, p. 308-310, 2008.

GLEZEN, W. P, Emerging infections: pandemic influenza. **Epidemiol. Rev.**, v. 18, p. 65-67, 1996.

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

GORMAN, O. T. et al. Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes: implications for the origin of H1N1 human and classical swine viruses. **J. Virol.**, v. 65, p. 3704-3714, 1991.

GUO, Y. et al. Characterization of a new avian-like influenza A virus from horses in China. **Virology**, v. 188, p. 245-255, 1992.

HAGURI, L. C. A. G. Virus respiratórios de origem humano em uma colônia de Mono rhesus (*Macaca mulatta*). Animales de Experimentacion. **La Revista Hispanoamericana**, v. 5, n. 1, p. 11-13, 2000.

HAMPSON, A.; COX, N. J. Global surveillance for pandemic influenza: Are we prepared? In: BROWN, L. E.; HAMPSON, A. W.; WEBSTER, R. G. **Options for the control of influenza III**. Amsterdam: Elsevier, 1996, p. 50.

HANNANT, D.; MUMFORD, J. A.; JESSET, D. M. Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus. **Vet. Record**, v. 122, p. 125-128, 1988.

HANNOUN, C.; DEVAUX, J. M. Circulation enzootique permanente de virus grippaux dans la baie de la Somme. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 3, p. 177-183, 1980.

HAY, A. J. et al. Transcription of the influenza virus genome. **Virology**, v. 83, p. 337-355, 1977.

HAY, A. J.; SKEHEL, J. J.; McCAULEY, J. Characterization of influenza virus RNA complete transcripts. **Virology**, v. 116, p. 517-522, 1982.

HAY, A. J. The virus genome and its replication. In: Nicholson, K. G.; Webster, R. G.; Hay, A. J. **Textbook of influenza**. London: Blackwell Science, Oxford, 1998, p. 43-53.

HEINEN, P. P. et al. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 82, p. 39–56, 2001.

HEINEN, P.P. Swine influenza: a zoonosis. **Vet. Sci. Tomorrow.**, p. 1-11, 2003. Disponível em: <http://www.vetscite.org/publish/articles/000041/print.ht>. Acesso em: 26 ago. 2009.

HELENIUS, A. Unpacking the incoming influenza virus. **Cell**, v. 69, p. 577-578, 1992.

HINSHAW, V. S. et al. The prevalence of Influenza víruses in swine and the antigenic and genetic relatedness of Influenza víruses from man and swine. **Virology**, v. 84, p. 51, 1978.

————— Replication of avian influenza A virus in mammals. **Infect. Immun.**, v. 34, n. 2, p. 354-361, 1981.

HINSHAW, V. S.; WEBSTER, R. G. The natural history of influenza viruses. In: BEARE, A. S. **Basic and Applied Influenza Research**. EUA: CRC Press, Boca Raton, 1982, p. 79-104.

HINSHAW, V. S. et al. Are seals frequently infected with avian influenza viruses? **J. Virol.** v.51, p. 863-865, 1984.

HINSHAW, V. S. Influenza in other species (seal, whale and mink). In: Nicholson, K. G.; Webster, R. G.; Hay, A. J. **Textbook of influenza**. London: Blackwell Science, Oxford, 1998, p. 163-167.

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.

HONDA, A. et al. Differentil roles of viral RNA and cRNA in functional modulation of the influenza vírus RNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 33, p. 31179-31185, 2001.

HORIMOTO, T. et al. Proprotein-processing endoprotein PC6 and furin both activate hemagglutinin of virulent avian influenza viruses. **J. Virol.**, v. 68, p. 6074-6078, 1994.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. **Clin. Microbiol. Reviews**, v. 14, p. 129-149, 2001.

HORISBERGER, M. A.; HALLER, O.; ARNHEITER, H. Interferon-dependent genetic resistance to influenza virus in mice: virus replication in macrophages is inhibited at an early step. **J. Gen. Virol.**, v. 50, p. 205-210, 1980.

HUANG, R. T. C. et al. The function of the neuroaminidase in membrane fusion induced by myxoviruses. **Virology**, v. 107, p. 313-319, 1980.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Informações referentes ao período de 1992 a 2006. Rio de Janeiro. 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 10 dez. 2009.

ITO, T. et al. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **J. Virol.**, v. 72, p. 7367-7373, 1998.

ITO, T.; KAWAOKA, Y. Avian influenza. In: Nicholson, K.G.; Webster, R.G.; Hay, A.J. **Textbook of influenza**. London: Backwell Science, Oxford, 1998, p. 126-136.

JANET, M. D. Equine influenza in dogs: Too late to bolt the stable door? **The Vet. Journ.** v. 171, p. 7-8, 2006.

JANKE, B. H. The significance o antigenic variation in swine Influenza virus for diagnosis. In: **Annual Swine Disease Conference for Practitioners**, Iowa: Iowa State University, v. 5, 1997.

KARACA, K. et al. Evaluation of the ability of canarypox-vectored equine influenza virus vaccines to induce humoral immune responses against canine influenza viruses in dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v. 68, p. 208-212, 2007.

KARASIN, A. I. et al. Genetic characterization of H1N2 influenza A viruses isolated from pigs throughout the United States. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 1073–1079, 2002.

————— Characterization of avian H3N3 and H1N1 influenza A viruses isolated from pigs in Canada. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4349–4354, 2004.

KASSIS, A. O amor que fica. **Kalunga**, ano 30, n. 139, p. 24-25, ago. 2002.

KATES, M. et al. Origin of lipids in influenza virus. **Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 27, p. 293-301, 1962.

KATZS, J. M. The impact of avian influenza viruses on public health. **Avian Dis.** v. 47, n. 3, p. 914-920, 2003.

KAWAMOTO, A. H. N. et al. Investigation of influenza in migrating birds, the primordial reservoir and transmitter of influenza in Brasil. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 36, n.1, p. 88-93, 2005.

KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. Origin of the haemagglutinin on /Equine/johannesburg/86 (H3N8): the first known equine influenza outbreak in South Africa. **Arch. Virol.**, v. 106, p. 159-164, 1989.

KIDA, H. et al. Potencial for transmission of avian influenza viruses to pigs. **J. Gen. Virol.**, v. 75, p. 2183-2188, 1994.

KILBOURNE, E. Recombination of influenza a viruses of human and animal origin. **Science**, v. 160, p. 74-76, 1968.

KILBOURNE, E. D.; KEHOE, J. M. Demonstration of antibodies to both hemagglutinin and neuraminidase antigens of H3H2 influenza A virus in domestic dogs. **Intervirol.**, v. 76, n. 6, p. 315–318, 1975.

KINGSBURY, D. W. Orthomyxoviridae and their replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH,

T. P.; ROZIMAN, B.; STRAUS, S. E. **Virology**. 2th ed. New York: Raven Press, 1990.

KIRKLAND, P. D. et al. Influenza virus transmission from horses to dogs, Australia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, n. 4, p. 699-702, 2010.

KLUMPP, K., RUIGROK, R. W., BAUDIN, F. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. **EMBO J.**, v. 16, n. 6, p. 1248-1257, 1997.

KRUTH, S. A.; CARMAN, S.; WEESE, J. S. Seroprevalence of antibodies to canine influenza virus in dogs in Ontario. **Can. Vet. J.**, v. 49, p. 800–802, 2008.

KUIKEN, T. et al. Avian H5N1 influenza in cats. **Science**, v. 306, p. 241, 2004.

LAI, A. C. K.; LIN, Y.; POWELL, D. Genetic and antigenic analysis of the influenza virus responsible for the 1992 Hong Kong equine influenza epizootic. **Virology**, v. 204, p. 673-679, 1994.

LAI, A. C. K. et al. Diverged evolution of recent equine-2 influenza (H3N8) viruses in the western hemisphere. **Arch. Virol.**, v. 146, p. 1063-1074, 2001.

LAMB, R. A.; CHOPPIN, P. W. Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. **Virology**, v. 112, p. 729-737, 1981.

LAMB, R. A.; KRUG, R. M. Orthomyxoviridae: The Virus and Their Replication. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROZIMAN, B.; STRAUS, S. E. **Virology**. 2th. New York: Raven Press, 1996, p.1353-1387.

LANG, G. et al. A new influenza A virus infection in turkeys. II. A highly pathogenic variant, A/turkey/Ontario/7732/66. **Can. Vet. J.**, v. 9, p. 151, 1968.

LARSON, H. E.; PARRY, R. P.; TYRRELL, D. A. Impaired polymorphonuclear leucocyte chemotaxis after influenza virus infection. **Br. J. Dis. Chest.**, v. 74, p. 56-62, 1980.

LAVAR, W.; WEBSTER, R. Studies on the origin of pandemic influenza. 3. Evidence implicating duck and equine influenza viruses as possible progenitors of the Hong Kong strain of human influenza. **Virology**, v. 51, p. 383-391, 1973.

LIMA-COSTA, M. F.; BARRETO, S. M. Tipos de estudos epidemiológicos: conceitos básicos e aplicações na área do envelhecimento. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.12, p.189-201, 2003.

LOUREIRO, B. O. et al. Soroepidemiologia da Influenza equina no Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 24, n. 1, p. 11-13, 2002.

LOUREIRO, B.O. 2004. **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**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2004. 135f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

LUNN, D. P. et al. Antibody responses to DNA vaccination of horses using the influenza vírus hemagglutinin gene. **Vaccine**, v. 17, p. 2245-2258, 1999.

LVOV, D. K.; ZHDANOV, V. M. Circulation of Influenza vírus genes in the biosphere. **Sob. Méd. Ver. Virol.**, v. 1, p. 129-152, 1987.

MAAS, R. et al. Avian influenza (H5N1) susceptibility and receptors in dogs. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, n. 8, p. 1219-1221, 2007.

MACKENZIE, J. S. et al. Isolation of ortho and paramyxoviruses from wild birds in Western Austrália, and the characterization of novel Influenza A viruses. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.**, v. 62, p. 89-99, 1984.

MANCINI, D. A. P. et al. Anti-human influenza protector antibody detected in horses as a zoonotic viruses. **J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 41, n. 6, p. 20-24, 2004.

MARKS, G.; BEATTY, W. K. **Epidemics**. New York: Scribner, 1976, p.274.

MARQUES, E. J.; NASCIMENTO, I. L. S.; UETANABARO, M. Pantanal - Aspectos relacionados às aves aquáticas e áreas de reprodução colonial. Resumos do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal - Manejo e Conservação. EMBRAPA/CPAP e Universidade Federal do Mato Grosso do Sul: 1996.

MARTIN, K.; HELENIUS, A. Nuclear transport of influenza vírus ribonucleoproteins: The viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell.**, v. 67, p. 117-130, 1991.

MASUREL, N. Serological characteristics of a "new" serotype of influenza A virus: the Hong Kong strain. **Bull WHO**, v. 41, p. 461-468, 1969.

MCGEOCH, D.; FELLNER, P.; NEWTON, C. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 73, p. 3045-3049, 1976.

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

MINUSE, E. et al. Studies of antibodies to 1956 and 1963 influenza viruses in horses and man. **J. Immunol.**, v. 94, p. 563-566, 1965.

MO, I.P. et al. Comparative pathology of chickens experimentally inoculated with avian influenza viruses of low and high pathogenicity. **Avian Diseases**, n. 41, p. 125-136, 1997.

MOHANTY, S. B.; DUTTA, S. K. **Virologia Veterinária**. v. 10, 1983. p.188-197.

MOIRIGNOT, A. **Les relations entre les grippez humaines et animals**. Tese pour le Doctorat Veterinaire - Faculté de Medicine de Créteil, Paris. 1977.

MONNE, I. et al. Genetic comparison of H9N2 AI viruses isolated in Jordan in 2003. **Avian Dis.**, v. 51, p. 451-454, 2007.

MOSES, H. E.; BRANDLY, C. A.; JONES, E. E. The pH stability of virus of Newcastle disease and fowl plague. **Science**, v. 105, p. 477, 1947.

MOTA, C. S. et al. Soroepidemiologia do vírus influenza, subtipos H1N1, H3N2 e H3N8, em suínos de municípios do Estado do Rio de Janeiro. In: I Simbravisa - Simpósio Brasileiro de Vigilância Sanitária, 2002, São Paulo - SP. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, p. 143, 2002.

MOULD, J.A. et al. Mechanism for proton conduction of the M2 ion channel of influenza A virus. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 12, p. 8592-8599, 2000.

MUMFORD, J. A.; CHAMBERS, T. M. Equine influenza. In: NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. **Textbook of influenza**. London: Backwell Science, Oxford, 1998, p. 146-162.

MURPHY, B. R.; WEBSTER, R. G. Orthomyxoviruses. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROZIMAN, B.; STRAUS, S. E. **Virology**. 2th ed. Philadelphia: Lappincott-Raven Plublishers, 1996, p. 1397-1445.

NAEEM, K. et al. Avian influenza in Pakistan: outbreaks of low- and highpathogenicity avian influenza in Pakistan during 2003-2006. **Avian Dis.** v. 51, p. 189-193, 2007.

NETO, T. J. **A História da Gripe - A influenza em todos os tempos e agora**. São Paulo: XII Editorial, 2001. 92p.

NEWTON, R.; COOKE, A.; ELTON, D. Canine influenza virus: Crossspecies transmission from horses. **Vet. Rec.** v. 161, p. 142–143, 2007.

NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. **Textbook of Influenza**. London: Backwell Science, Oxford. 1998.

NIKITIN, T.; COHEN, D.; TODD, J. D. Epidemiological studies of A/Hong Kong/68 virus infection in dogs. **Bull. World. Health. Organ.** v. 47, p. 471–479, 1972.

OIE – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE ANIMAL. **Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines**, 6<sup>th</sup> ed. Chapter 2.3.4.; 2.5.7 e 2.8.8. 2008a. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00052.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00052.htm). Acesso em: 17 jan. 2010.

————— **Equine and Avian Influenza**. In: International Animal Health Code, Chapter, 17<sup>th</sup> ed. Chapter 12.7;10.4. 2008b. Disponível em: [http://www.oie.int/eng/normes/mcode/code2008/es titre 2.5 htm](http://www.oie.int/eng/normes/mcode/code2008/es_titre_2.5.htm). Acesso em: 17 jan. 2010.

————— **Weekly disease information**. In: International Animal Health Code. 2010. Disponível em: [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly\\_report\\_index&admin=0](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=weekly_report_index&admin=0). Acesso em 25 mar. 2010

OLALEYE, O. D. et al. Hemagglutination inhibition (HI) antibodies against strains of influenza A virus in horse and pig sera in Nigeria. **Journal of Hygiene Epidemiology Microbiology and Immunology**, v. 34, n. 4, p. 365-370, 1999.

OLIVEIRA, G. S. **Inquérito Soroepizootiológico do vírus influenza, subtipos H3N8 e H7N7 em equídeos apreendidos no Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: UFRRJ, 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OLIVEIRA JUNIOR, J. G. **Inquérito soropidemiológico para os vírus da Influenza. subtipos H1N1 e H3N2 em suínos no Estado do Mato Grosso do Sul.** Rio de Janeiro: UFRRJ, 2004. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OLSEN, C. W. et al. **Diseases of Swine.** USA: Iowa State University Press, p. 469–482, 2005.

O'NEILL, R. E.; TALON, J.; PALESE, P. The influenza virus NP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. **Embo J.**, v. 17, n. 1, p. 288-296, 1998.

PAGANO, M. C.; PASSOS, W. S.; CUNHA, R. G. Anticorpos inibidores de hemoaglutinação para os vírus de influenza equina em soros de equídeos de várias regiões do Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 7, n. 7, p. 194-198, 1985.

PAIVA, T. M. et al. Outbreak of Influenza type a (H1N1) in Iporanga, São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.**, v. 43, n. 6, p. 311-315, 2001.

PAVLOVIC, J. et al. Resistance to influenza virus and vesicular virus conferred by expression of human MxA protein. **J. Virol.**, v. 64, p. 3370-3375, 1990.

PAYUNGORN, S. et al. Influenza A Virus (H3N8) in Dogs with Respiratory Disease, Florida. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 14, n. 6, p. 902-908, 2008.

PEIRIS, J. S. M. et al. Cocirculation of avian H9N2 and contemporary “human” H3N2 influenza A viruses in pigs in southeastern China: potential for genetic reassortment. **J. Virol.**, v. 75, p. 9679–9686, 2001.

PESCHKE, T. et al. Role of macrophage cytokines in influenza a virus infections. **Immunobiol.**, v. 189, p. 340-355, 1993.

POTTER, C. W. Chronicle of influenza pandemic: NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. **Textbook of influenza.** London: Backwell Science, Oxford, 1998, p. 20-29.

PYLE, G. F.; PATTERSON, K. D. Symposium on the Asian influenza epidemic, 1957. **Proc. Roy. Soc. Med.**, v. 51, p. 1009-1015, 1956.

RAYAN-POIRIER, K. A. et al. Application of Directgen FLU-A for the detection of influenza A virus in human and nonhuman specimens. **J. Clin. Microbiol.**, v.30, p.1072-1075, 1992.

READING, P. C.; MILLER, J. L.; ANDERS, M. Involvement of the Mannose Receptor in Infection of Macrophages by Influenza Virus. **Journ. Virol.**, v. 74, p. 5190-5197, 2000.

ROGERS, G.; PAULSON, J. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity based on species of origin. **Virology**, v. 127, p. 361-373, 1983.

ROSAS, C. et al. Evaluation of a vectored equine herpesvirus type 1 (EHV-1) vaccine expressing the H3 haemagglutinin in the protection of dogs against canine influenza. **Vaccine**, v. 26, n. 19, p. 2335-2343, 2008.

RUFF, M. Interferon-mediated development of influenza virus resistance in hybrids between Mx gene-bearing and control mouse embryo fibroblasts. **J. Gen. Virol.**, v. 64, p. 1291-1300, 1983.

SALCEDO J. R. C. 1980. **Ocorrência de Influenza em aves selvagens e pássaros ornamentais no Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1980. 61f. Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

SCHILD, G.; STUART-HARRIS, C. Serological and epidemiological studies with influenza A viruses. **J. Hygiene**, v. 63, p. 479-490, 1965.

SCHÖLL, K. C. Comparation of the applied control measures against highly pathogenic avian influenza (HPAI) in Europe (Kingdom of the Netherlands) and Asia (Kingdom of Thailand and the socialist republic of Vietnam). 2005. Tesis (Doctor of animal production). University of Hohenheim. Disponível em: [www.troz.unihohenheim.de/research/thesis/MScAP/Schoel.pdf](http://www.troz.unihohenheim.de/research/thesis/MScAP/Schoel.pdf). Acesso em: 11.nov. 2009.

SCHOLTISSEK, C. Pigs as “mixing vessels” for the creation of new pandemic Influenza A viruses. **Med. Principles Pract.**, v. 2, p. 65-71, 1990.

SCHULTZ-CHERRY, S.; HINSHA, V. S. Influenza virus neuroaminidase activates latent transforming growth factor beta. **J. Virol.**, v. 70, n.12, p. 8624-8629, 1996.

SHAW, M. W.; CHOPPIN, P. W.; LAMB, R. A. A previously unrecognized influenza B virus glycoprotein from a bicistronic mRNA that also encodes the viral neuraminidase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 80, p. 4879-4883, 1983.

SHORTRIDGE, K. F. Avian Influenza A viruses of Southern China and Hong Kong ecological aspects and implications for man. **Bulletin of the World health Organizacion**, v.60, n.01, 129-135, 1982

SICK, H. Composição da avifauna brasileira. In: PACHECO, J.F. **Ornitopatologia brasileira**. Brasil: Nova Fronteira. 2001, p. 129-135.

SIQUEIRA, M. A. M. T. Instituto Oswaldo cruz. Departamento de virologia – Dados gerados pelo laboratório de vírus respiratório e sarampo. Comunicação pessoal. 2008.

SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 531–569, 2000.

————— Influenza hemagglutinin. **Vaccine**, v. 20, n. 2, p. 51-54, 2002.

SLEPUSHKIN, V. A. et al. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. **Vaccine**, v. 13, p. 1399-1402, 1995.

SMITH, W.; ANDREWES, C. H.; LAIDLAW, P. P. A virus obtained from influenza patients. *Lancet* ii, p.66-68. 1933. **Acta Virol.**, v. 38: p. 25-26, 1933.

SMITH, K. C. et al. Canine influenza virus. **Vet. Rec.**, v. 157, p. 599, 2005.

SOARES, P. B. et al. Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. *J. Virol. Methods.*, v. 123, n. 2, p.125-130, 2005.

SONG, D. et al. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. **Emerg Infect Dis.**, v. 14, p. 741-746, 2008.

————— Experimental infection of dogs with avian-origin canine influenza A virus (H3N2). **Emerg Infect Dis.**, v. 15, p. 56-58, 2009.

SONGSEEM, T. et al. Avian influenza H5N1 in naturally infected domestic cat. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, n. 4, p. 681-683, 2006.

SOVINOVA, O. et al. Isolation of a virus causing respiratory diseases in horses. **Acta Virol.**, v. 1, p. 52-61, 1958.

STAEHEL, P.; HALLER, O. Interferon-induced Mx protein: a mediator of cellular resistance to influenza virus. **Interferon**, v. 8, p.1-23, 1987.

STAEHEL, P. Interferon-induced proteins and the antiviral state. **Adv. Virus Res.**, v. 38, p.147-200, 1990.

STEVENSON, P. G.; DOHERTY, P. C. Cell-mediated immune response to influenza virus. In: Nicholson, K. G.; Webster, R. G.; Hay, A. J. **Textbook of influenza**. London: Backwell Science, Oxford. 1998. p. 278-287.

STUART-HARRIS, C. H.; SCHILD, G. C.; OXFORD, J. S. *Influenza: the viruses and the disease*. 2th ed. Edward Arnold. 1985.

SUZUKI, I. T. et al. Recognition of N-glycneuraminic acid linked to galactose by the alpha 2,3 linkage is associated with intestinal replication of influenza A virus in ducks. **J. Virol.**, v. 74, p. 9300-9305, 2000.

SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **O desafio da influenza: Epidemiologia e Organização da Vigilância no Brasil**. Boletim eletrônico epidemiológico. v. 4, n. 1, p. 1-7. 2004

————— SVS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 6 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 434p. 2005a. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>. Acesso em: 09 nov. 2008.

————— **Vigilância da Influenza no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005b. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>. Acesso em: 09 nov. 2008.

————— Plano de preparação brasileiro **A situação epidemiológica mundial da influenza e a preparação do Brasil para uma pandemia** (Nota técnica de 18/10/2005). Brasília: Ministério da Saúde, 2005c. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude>. Acesso em: 09 nov. 2008.

————— Boletim eletrônico epidemiológico: Influenza Pandêmica (H1N1) 2009 – Análise da situação epidemiológica e da resposta no ano de 2009. Ano 10, n.2, 2010a. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_influenza\\_22\\_03\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_influenza_22_03_2010.pdf). Acesso em: 15 mar. 2010

————— Protocolo de vigilância epidemiológica de eventos adversos pós-vacinação – Estratégia de vacinação contra o vírus influenza pandêmico (H1N1). p. 1-61, 2010b. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/prot\\_de\\_vig\\_epi\\_e\\_adventos\\_adversos\\_pos\\_vac.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/prot_de_vig_epi_e_adventos_adversos_pos_vac.pdf). Acesso em: 15 mar. 2010.

————— Estratégia nacional de vacinação contra o vírus influenza pandêmico (H1N1) 2009. Informe Técnico Operacional. 34p. 2010c. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_tecnico\\_vacina\\_18\\_03.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_tecnico_vacina_18_03.pdf). Acesso em: 15 mar. 2010

\_\_\_\_\_ Estratégia de vacinação contra influenza pandêmica (H1N1) 2009 e Influenza Sazonal.-Nota Técnica Nº 011/2010 DEVEP/SVS. 2010d. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt\\_vacina\\_influenza\\_04\\_03\\_10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/nt_vacina_influenza_04_03_10.pdf). Acesso em: 15 mar. 2010.

\_\_\_\_\_ Informe técnico mensal de influenza pandêmica (H1N1) 2009 – Monitoramento de síndrome respiratória aguda grave em pacientes hospitalizados, semana epidemiológica 1 a 13 de 2010. 2 ed. 2010e. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe\\_influenza\\_abril\\_2010.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/informe_influenza_abril_2010.pdf). Acesso em: 10 abr. 2010

SWENSON, S.L. et al. A comparison of diagnostic assays for the detection of type A swine influenza virus from nasal swabs and lungs. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 13, p. 36–42, 2001.

TAUBENBERGER, J. K. et al. Initial genetic characterization of the 1918 “Spanish” influenza virus. **Science**, v. 275, p. 1793-1796, 1997.

THOMAS, D. B. et al. Antibody-mediated immunity. In: NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. **Textbook of influenza**. London: Backwell Science, Oxford. 1988, p. 267-277.

TUMOVA, B. Equine Influenza: a segment in influenza virus ecology. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 3, p. 45-59, 1980.

VICARIA, L. A cura pelo bicho. **Revista Época**, São Paulo, p. 83-91, 04 ago. 2003.

WADDELL, G.; TEIGLAND, M.; SIGEL, M. A new influenza virus Associated with equine respiratory disease. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 143, p. 587- 590, 1963.

WAGNER, R.; MIKHAIL, M.; KLENK, H. D. Functional balance between haemagglutinin and neuroaminidase in influenza virus infections. **Rev. Med. Virol.**, v. 12, p. 159-166, 2002.

WAHAL, S. M. Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a case and a cure. **J. Clin. Immunol.**, v. 12, p. 61-74, 1992.

WALKER, J. A. et al. Sequence specificity of furin, a proprotein-processing endoprotease, for the hemagglutinin of a virulent avian influenza virus. **J. Virol.**, v. 67, p. 1213-1218, 1994.

WEBSTER, R. G. Estimation of the molecular weights of the polypeptide chains from the isolated hemagglutinin and neuroaminidase subunits of influenza viruses. **Virology**, v. 40, p. 643, 1970.

————— Are equine 1 influenza viruses still present in horses? **Equine Vet. J.**, v. 25, p. 537-538, 1993.

————— The importance of animal influenza for human disease. **Vaccine**, v. 20, p. 516-520, 2002.

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and Ecology of influenza A viruses. **Microbiological Reviews**, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992.

WEBSTER, R. G.; BEAN JR, W. J. Evolution and ecology of Influenza viruses: Inter-species transmission. In: NICHOLSON, K. G.; WEBSTER, R. G.; HAY, A. J. **Textbook of Influenza**. Blackwell Science, Oxford, 1998.

WHARTON, S. A. et al. Membrane fusion by influenza viruses and the mechanism of action of amantadine. In: LAVER, W. G.; AIR, G. M. **Use of X-ray Crystallography in the Design of Antiviral Agents**. EUA: Academic Press, p.1-12, 1990.

WHITTAKER, G.; BUI, M.; HELENIUS, A. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. **J. Virol.**, v. 70, n. 5, p. 2743-2756, 1996.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION Study Group. A revised system of nomenclature for influenza viruses. **World. Hlth. Org.**, v. 45, n. 1, p. 119-124, 1971.

————— **Manual on Animal Influenza Diagnosis and Surveillance.** World. Hlth. Org.,WHO/CDS/CSR/NCS/2002.5. 99p. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/>. Acesso em: 25 ago. 2008

————— Epidemiology of WHO-confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) infections. *Wkly Epidemiol. Rec.* v. 81, n. 26, p. 249-257, 2006a

————— **Avian Influenza (“Bird Flu”): Fact sheet.** 2006b. Disponível em: [http://www.who.int/medicentre/factsheets/avian\\_influenza/en/index.html/](http://www.who.int/medicentre/factsheets/avian_influenza/en/index.html/) Acesso em: 13 out. 2008

————— **Communicable Disease Surveillance & Response (CSR): Influenza.** World. Hlth. Org. 2007. Disponível em: <http://www.who.int/csr/disease/influenza/en/>. Acesso em: 13 out. 2008.

————— **H5N1 avian influenza: Timeline of major events.** 2009a. Disponível em: [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/ai\\_timeline/en/index.html/](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/ai_timeline/en/index.html/) Acesso em: 02 dez. 2010

————— **The influenza outbreak in humans caused by influenza A/H1N1 – Considerations at the human-animal interface.** INFOSAN-Information Note No. 2, 2009b. Disponível em: [http://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/infosan\\_archives/en/](http://www.who.int/foodsafety/fs_management/infosan_archives/en/). Acesso em: 02 dez. 2009.

————— **Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A (H5N1) reported to WHO.** World. Hlth. Org. 2010. Disponível em: [http://www.who.int/csr/disease/avian\\_influenza/country/cases\\_table\\_2010\\_03\\_16/en/index.html](http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2010_03_16/en/index.html) . Acesso em: 15 mar. 2010.

WILEY, D. C.; SKEHEL, J. J. Viral membranes. In: FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; CHANOCK, R. M.; MELNICK, J. L.; MONATH, T. P.; ROZIMAN, B.; STRAUS, S. E. **Virology**. 2th ed. New York: Raven Press, 1990, p. 63-85.

WILSON, L. A.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3A resolution. **Nature**, v. 289, p. 366-373, 1981.

YAMANE, N.; ODAGISI, T.; ARIKAWA, J. Isolation of orthomyxoviruses from migrating and domestic ducks in Northern Japan in 1976-79. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v. 31, p. 407-415, 1978.

YATES, P.; MUNFORD, J. A. Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation. **Vet. Microbiol.**, v. 74, p. 173-177, 2000.

YINGST, S. L.; SAAD, M. D.; FELT, S. A. Qinghai-like H5N1 from domestic cats, northern Iraq. **Emerg Infect Dis.**, v. 12, p. 1295-1297, 2006.

YOON, K. J. et al. Influenza virus infection in racing greyhounds. **Emerg Infect Dis.**, v. 11, n. 12, p. 1974-1976, 2005.

ZEBEDEE, S. L.; LAMB, R. A. Influenza virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. **J. Virol.**, v. 62, p. 2762-2772, 1988.

ZHANG, W.; EVANS, D. H. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase chain reaction. **J. Virol. Meth.**, v. 33, p. 165-189, 1991.

ZHOU, N. N. et al. Rapid evolution of H5N1 influenza viruses in chickens in Hong Kong. **J. Virol.**, v. 73, n. 4, p. 3366-3374, 1999.