

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

INFLUENZA AVIÁRIA: ASPECTOS SOBRE VACINAÇÃO E ESTRATÉGIAS DIVA

Autor: Moacir Vieira Semprebon Jr.

PORTO ALEGRE
2015/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

INFLUENZA AVIÁRIA: ASPECTOS SOBRE VACINAÇÃO E ESTRATÉGIAS DIVA

Autora: Moacir Vieira Semprebon Jr.

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

Monografia apresentada à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção de graduação em Medicina
Veterinária

PORTO ALEGRE
2015/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o carinho e esmero a minha formação.

Faço um agradecimento especial ao meu orientador, Professor Hamilton Luiz de Souza Moraes, pela paciência e boa vontade em ensinar.

RESUMO

A influenza aviária é uma doença viral, infectocontagiosa, que acomete os tratos respiratório e digestivo e sistema nervoso de diversas espécies de aves. É uma doença que pode cursar com sinais clínicos variados, podendo ser uma infecção subclínica ou com altas mortalidades. Além dos devastadores prejuízos causados pela doença clínica na avicultura, a influenza aviária, assim como a doença de Newcastle, pode levar a implantação de barreiras sanitárias por outros países, visando a proteção da produção interna. Políticas de erradicação são comuns, mas tem sido questionadas em áreas endêmicas. A vacinação é uma medida de controle que atenua os sinais clínicos e diminuiu a replicação e excreção viral. Entretanto seu maior problema é a perda da capacidade de diagnóstico da infecção pelo sorologia, que é a mais prática ferramenta de vigilância. As estratégias DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) se propõem resolver estes problemas comerciais. Neste trabalho, serão descritos diferentes mecanismos que permitem diferenciar os animais vacinados dos que se infectaram com o vírus de campo.

Palavras-chave: Influenza aviária; DIVA; vacinação; imunologia.

ABSTRACT

Avian influenza is a viral, infectious disease that affects the respiratory and digestive tracts and nervous system of many species of birds. It can be associated with different clinical signs and may be a subclinical infection or high mortality. In addition to the devastating losses caused by clinical disease in poultry, avian influenza, like Newcastle disease, can lead to establishment of sanitary barriers by other countries to protect domestic production. Stamping-out policies are common but have been questioned in endemic areas. Vaccination is a measure of control that mitigates the clinical signs and decreased viral replication and excretion. However, his biggest problem is the loss of diagnostic capability of infection serology, which is the most practical surveillance tool. The DIVA strategy (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) propose to solve these trade problems. In this paper, will be described different mechanisms to differentiate between vaccinated and who became infected with the field virus.

Keywords: Avian influenza; DIVA; vaccination; immunology.

LISTA DE ABREVIATURAS

HA – Hemaglutinina

HPAI – *High Pathogenic Avian Influenza*

LPAI – *Low Pathogenic Avian Influenza*

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

NA - Neuraminidase

rFPV - *Recombinant Fowl Poxviruses*

TT – Toxóide tetânico

USDA – *United States Department of Agriculture*

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	8
2 - O VÍRUS	9
3 - VÍRUS DE ALTA E BAIXA PATOGENIA - HPAI & LPAI	11
4 - DRIFT & SHIFT ANTIGENICO.....	12
5 - CICLO VIRAL.....	13
6 - DOENÇA CLÍNICA	15
7 - SURTOS PELO MUNDO.....	16
7.1. Estados Unidos da América	16
7.2. Austrália	17
7.3. Chile	17
8 - IMPORTANCIA DA VACINA.....	18
9 - POSSÍVEIS REVESES DA VACINAÇÃO	20
10 - ESTRATÉGIAS DIVA	21
10.1. Sentinelas	21
10.2. Vacinas de Subunidade	22
10.3. Neuraminidase Heteróloga.....	23
10.4. NS1.....	24
10.5. Marcadores Exógenos	25
11 - DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS	26
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS	27

1 - INTRODUÇÃO

A influenza aviária é uma doença viral, infectocontagiosa que acomete os tratores respiratório e digestivo e o sistema nervoso de várias espécies de aves. O vírus da influenza aviária é um patógeno de grande importância econômica e de saúde pública no mundo todo. A influenza aviária é uma doença que pode cursar desde infecções subclínicas até formas altamente virulentas, com 100% de letalidade. É muito difícil fazer previsões sobre as consequências de um surto de influenza devido ao grande número de fatores que vão influenciar as características biológicas do vírus. Subtipo antigênico, infecções concomitantes, principalmente aquelas que cursam com imunossupressão, estresse ambiental, idade, sexo e condições de biossegurança fazem com que a morbidade e mortalidade variem de menos de 1% até 100% (MACARI, 2000).

Os hospedeiros e reservatórios naturais de todos os vírus da influenza tipo A são as aves aquáticas silvestres, principalmente patos, gaivotas e aves costeiras (SLEMONS, 1974) Nestas aves de vida livre, não há relatos sobre problemas causados pelo vírus. No Brasil, até o momento, não existe diagnóstico clínico ou laboratorial da doença. Entretanto existem aves aquáticas que migram da América do Norte até o sudeste e sul do Brasil, e há grande preocupação que estas aves possam iniciar surtos da doença no país. A distribuição da doença está claramente influenciada pela distribuição das aves domésticas e das aves silvestres, principalmente as aves aquáticas, e está relacionada com a localização da produção avícola, rotas migratórias e estação do ano. Em algumas regiões dos Estados Unidos os surtos de influenza aviária em perus coincidem com a migração de patos silvestres (MACARI, 2000).

2 - O VÍRUS

O vírus da influenza aviária pertence à família *Orthomyxoviridae*. Todos os vírus desta família possuem envelope e material genético baseado em RNA de fita simples com polaridade negativa. Esta família abrange cinco diferentes gêneros: influenza tipo A, tipo B, tipo C, Isavirus e Thogovirus. Apenas o vírus influenza tipo A apresenta RNA segmentado e caráter zoonótico importante, podendo acometer humanos, aves, suínos e equinos. Os tipos B e C são patógenos restritos aos humanos, são menos agressivos que o tipo A e dificilmente afetam outras espécies (PALESE & SHAW, 2007). O Isavirus é um importante patógeno na piscicultura, causando a anemia infecciosa do salmão e o Thogovírus são as arboviroses (SWAYNE et al., 2009).

Todos os vírus da influenza têm oito genes que codificam pelo menos dez proteínas. As proteínas estruturais do vírion podem ser divididas entre as proteínas de membrana, que são compostas pela hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA) e proteína de canal de membrana (M2), e as proteínas internas, que incluem a nucleoproteína (NP), a proteína matriz (M1), o complexo de polimerase PB1, PB2 e PA. Duas outras proteínas adicionais expressadas pelo vírus são as proteínas não estruturais – proteína não estrutural 1 (NS1) e proteína não estrutural 2 (NS2).

A morfologia viral pode ser extremamente variável, podendo ser partículas esféricas com o diâmetro de 80 a 120 nm até formas filamentosas com diferentes comprimentos. A forma filamentosa parece predominar nos isolados clínicos, mas depois de passagem em cultivo celular ou ovos embrionados, o vírus frequentemente muda a sua morfologia (MCNULTY et al., 1985). A estrutura do vírus inclui uma membrana lipídica derivada da célula hospedeira com três proteínas virais: hemaglutinina, neuraminidase e proteína de canal de membrana 2. Esta última é uma pequena proteína de canal de íons que tem função no *'uncoating'* viral, ou seja, na liberação do material genético do vírus para dentro da célula hospedeira (SWAYNE et al., 2009). A hemaglutinina é um trímero que se parece com espinhos na membrana lipídica e é a proteína de membrana mais abundante. A neuraminidase é um polímero composto por quatro unidades menores que possuem uma forma mais globular (BAKAR et al., 2009).

O agente se propaga bem em laboratório, fato que tem permitido o seu melhor estudo. O vírus da influenza aviária, humana, suína, e equina são propagados em ovos de galinha embrionados e este método é comumente usado para diagnóstico e também para produção de vacinas. Entretanto recentemente, tem se dado mais ênfase, principalmente para as influências de mamíferos, na produção e estudo do vírus em cultivo celular (SWAYNE, 2008).

Uma classificação muito utilizada é a divisão dos vírus da influenza de acordo com a sua antigenicidade, que é determinada por duas glicoproteínas localizadas na superfície viral: a hemaglutinina (H ou HA) e a neuraminidase (N ou NA). Atualmente são conhecidas 16 tipos de hemaglutininas e nove de neuraminidasas. Estas tipos de proteínas podem se combinar gerando, teoricamente, 144 classificações diferentes. Entretanto é notado que algumas combinações ocorrem com mais frequência (SUAREZ, 2005).

A HA é responsável pela ligação do vírus ao receptor da célula do hospedeiro, pela penetração do vírus na membrana citoplasmática e também pela capacidade hemaglutinante do vírus. Os anticorpos contra HA são muito importantes na neutralização do vírus e na proteção contra a infecção. A NA é a responsável pela liberação de novos vírus das células do hospedeiro

por meio de sua ação sobre o ácido neuramínico da célula. Os anticorpos contra NA também são importantes para a proteção contra a infecção, embora em menor proporção (ANDREATTI, 2007).

A nomenclatura para descrever os vírus de influenza foi proposta por especialistas da Organização Mundial da Saúde nos anos 80. Foi padronizada para prover uma nomenclatura informativa e intuitiva para todos os vírus de influenza. As características utilizadas na padronização de novos vírus incluem nesta ordem: o tipo antigênico (A, B ou C); o hospedeiro no qual o vírus foi isolado, sendo que em isolados humanos esta característica pode ser omitida, ficando assim implícita; origem geográfica do isolado, que pode ser uma cidade, estado ou país; número de controle da amostra do laboratório que realizou o isolamento; ano do isolamento; e por fim, incluem-se entre parênteses os subtipos HA e NA. Por exemplo, um vírus da influenza, isolado de perus em Missouri seria classificado como A/turkey/Missouri/24093/1999 (H1N2).

3 - VÍRUS DE ALTA E BAIXA PATOGENIA - HPAI & LPAI

A Organização Mundial para Saúde Animal – OIE, classifica o vírus da influenza aviária quanto ao seu grau de patogenicidade em alta ou *High Pathogenicity Avian Influenza* (HPAI) ou baixa patogenicidade ou *Low Pathogenicity Avian Influenza* (LPAI). Cepas HPAI são aquelas que possuem o índice de patogenicidade (IVPI) em aves de seis semanas de idade maior que 1,2 ou que cause pelo menos 75% de mortalidade em aves de quatro a oito semanas de idade infectadas por via intravenosa. Cepas H5 ou H7 que não possuem IVPI maior que 1,2 ou cause menos que 75% de mortalidade no teste de infecção intravenosa, devem ser sequenciados para determinar os aminoácidos básicos estão presentes no sítio de clivagem da molécula de hemaglutinina. Se a sequência de aminoácidos for semelhante àquela observada em cepas de alta patogenicidade, o isolado testado será considerado de alta patogenicidade. Qualquer vírus que não seja H5 nem H7, mas que mate de uma a cinco galinhas susceptíveis infectadas intravenosamente e que cresça em cultivo celular na ausência de tripsina também será considerado de alta patogenicidade (SWAYNE et al., 2009).

Cepas HPAI são de notificação obrigatória e imediata a OIE. Todas as cepas HPAI já identificadas são dos subtipos H5 ou H7. Entretanto existem cepas H5 e H7 que apresentam baixa patogenicidade (ANDREATTI, 2007).

A característica que difere LPAI de HPAI é a habilidade que as HPAI podem ser clivadas por proteases ubíquas, encontradas na maioria das células dos hospedeiros. O Influenza vírus requer que a HA, que é produzida como um único polipeptídeo, seja clivada entre as subunidades HA1 e HA2 antes de se tornar infeccioso. Vírus de baixa patogenicidade são clivados por proteases encontradas em um número limitado de tecidos e células do corpo. Vírus não patogênicos são clivados por proteases chamadas *like-tripsina*, como associação a enzima tripsina, necessária para ativar a infectividade viral *in vitro*. Normalmente tripsina ou enzimas *like-tripsina* clivam a HA reconhecendo um único aminoácido arginina (BROWN et al., 2005). Entretanto, quando múltiplos aminoácidos estão presentes no sítio de clivagem da HA, este sítio se torna disponível a outras proteases encontradas em diferentes células do corpo (SENNE et al., 1996). Desta forma, neste último caso a replicação é mais agressiva. Outros genes virais também são importantes para a virulência do vírus, mas o sítio de clivagem da HA é de longe o mais importante fator de virulência (HIRST et al., 2004).

As cepas LPAI podem ter diferentes subtipos HA e NA. As HPAI, por motivos desconhecidos, se restringem as cepas H5 e H7. Porém, a maioria das cepas H5 e H7 são de baixa patogenicidade. Se acredita que as cepas HPAI surgem de cepas LPAI H5 ou H7 que circularam em uma região por períodos extensos de tempo. Isto de fato ocorreu em alguns países. Cepas LPAI circularam por alguns meses em propriedades na Pennsylvania em 1983, no México em 1994 e na Itália em 1999, antes de se tornar HPAI (TRACEY et al., 2004 & ALEXANDER et al., 1979)

4 - DRIFT & SHIFT ANTIGENICO

O vírus da influenza possui dois mecanismos para prover a diversidade genética na população viral: uma altíssima taxa de mutação e a habilidade de misturar (*reassortment*) o material genético (KIM, 2006. SLEMONS, et al., 2008). Ambos os métodos são adaptações evolutivas que permitem que o vírus busque novas formas de rapidamente se adaptar e de estabelecer infecções em novas espécies.

Mais de um vírus podem infectar a mesma célula hospedeira. Quando isso acontece, novos vírus podem surgir com características de ambos vírus originais. Por exemplo, se uma célula está infectada com um vírus de origem aviária e um vírus de origem humana co-infectar a mesma célula, porções genômicas dos dois vírus podem se misturar resultando em um vírus completamente novo, não apenas uma nova cepa. Esta situação é chamada de *shift* antigênico e pode trazer consequências muito mais sérias do que o *drift* antigênico. O *drift* antigênico são as mutações pontuais do vírus. A grande preocupação é que um possível novo vírus, através do *shift* antigênico, poderia herdar a patogenicidade do vírus da influenza aviária e a habilidade do vírus da influenza humana de se transmitir de pessoa a pessoa. Isto é particularmente preocupante com os suínos, que são susceptíveis a ambas as infecções, e é como uma pandemia pode se originar (COLVILLE, 2007).

Os vírus da influenza podem diferir enormemente na sequência de aminoácidos, particularmente na superfície das glicoproteínas, HA e NA (LIU et al., 2005). Estas diferenças na sequência de aminoácidos resultam em diferenças na antigenicidade. Estas diferenças antigênicas têm grandes implicações na vacinação, já que a proteção vacinal é mediada primariamente por anticorpos específicos sendo produzidos para a HA e, em menor extensão, a NA (GLOBIG et al., 2007). O fato de produzir anticorpos para um subtipo de HA deveria neutralizar todos os vírus do mesmo subtipo, porém, diferenças na especificidade do anticorpo afeta o nível de produção observada. O impacto do *drift* antigênico na vacinação da influenza humana é um problema bem caracterizado. De fato, o *drift* antigênico é o motivo de as cepas vacinais terem que ser reavaliadas anualmente para encontrar a melhor chance de imunização possível (ROJAS, 2002).

Para as aves, o *drift* antigênico também ocorre, mas a interpretação e a importância deste processo são muito mais complicadas. Os princípios de mudanças nos sítios antigênicos que afetam a especificidade do anticorpo são os mesmos para a resposta imune nas aves, entretanto, o momento em que é necessária a mudança antigênica não está definido. Em parte isto se deve às diferenças patobiológicas entre a influenza humana e a HPAI em aves. Na influenza humana, a infecção viral se dá no trato respiratório, enquanto na HPAI em aves o vírus tem replicação sistêmica e na mucosa (COLVILLE, 2007).

5 - CICLO VIRAL

O passo inicial da infecção é a ligação da HA viral ao receptor de ácido siálico da célula hospedeira. Ácido siálico é o termo genérico para um sítio terminal de açúcar encontrado em glicoproteínas. As moléculas de ácido siálico podem ser classificadas em como se ligam ao açúcar subjacente pelo carbono α -2. As ligações mais comuns são através de α -2,3 e α -2,6 (STALLNECHT et al., 1990). Diferentes animais terão diferentes padrões e níveis de expressão de ácido siálico α -2,3 e α -2,6. O ácido siálico α -2,3 é tipicamente expresso em aves e α -2,6, em humanos. A conformação de ácido siálico contribui para a especificidade do hospedeiro, mas provavelmente é apenas um dos fatores que contribuem para a barreira inter-espécie. Humanos e algumas aves expressam ambos tipos de ácido siálico, entretanto com diferente distribuição nos tecidos (SWAYNE et al., 2005). Outro fator é a especificidade da HA para cada tipo de ácido siálico não é absoluta. Alguns vírus podem se ligar a ambos os receptores (VILLAREAL, 2003).

Os suínos possuem grandes níveis de ambos receptores em seu epitélio respiratório. A teoria indica que os suínos podem, dessa forma, se infectar simultaneamente com vírus de origem mamífera e aviária, promovendo rearranjo genético dessas duas cepas, resultando assim em possíveis cepas pandêmicas (CAPUA et al., 2004). De fato, Slemons et al., (1990) descreveram vírus isolados de suínos, com complexos rearranjos genéticos. Entretanto, os recentes surtos em humanos (H5N1, H9N2, H7N7 e H7N3) mostraram que o maior fator de risco foi a exposição a aves infectadas, não a suínos (SWAYNE et al., 1994)

Uma vez que ocorre a adsorção viral, o vírus é endocitado e quando o endossoma se acidifica, ocorre a fusão do domínio da HA, liberando o RNA viral no citoplasma da célula hospedeira. A proteína M2 tem um papel fundamental neste processo. É a proteína de membrana que permite a entrada de íons H⁺ no vírion, abaixando o pH, o que causa a mudança conformacional da HA (SWAYNE et al., 2000). Algumas classes de drogas antivirais, como o adamantano, agem bloqueando a fusão da proteína M2, o que evita a fusão da HA com o endossoma (STALLKNECHT et al., 1988). A fusão da membrana viral com a membrana do endossoma permite a liberação do complexo RNA polimerase viral no citoplasma.

No núcleo, o RNA de sentido negativo é copiado em mRNA de sentido positivo pelo complexo de polimerase, que inclui três polimerases e a nucleoproteína. O vírus também usa proteínas do hospedeiro para iniciar a síntese de mRNA, incluindo a RNA polimerase II. Este mRNA migra então para o citoplasma e serve de modelo para a produção do RNA de sentido negativo que fará parte do vírion (SWAYNE, 2009). Duas proteínas virais, M1 e NEP são cruciais para o trânsito das proteínas virais do núcleo e para o núcleo. A proteína M1 também tem um papel importante na montagem estrutural do vírion (ALEXANDER et al., 2008).

O processo de empacotamento do vírus parece ser bastante ineficiente e muitas partículas virais não carregam todos os oito segmentos de genes, criando uma grande proporção de partículas virais defeituosas. É estimado que mais de 90% das partículas virais não são infecciosas (BARR et al., 1986). No processo de empacotamento do vírus, múltiplos genes podem ser incluídos no vírion, principalmente os genes menores. Este fenômeno pode afetar o fenótipo do vírus. Há estudos que sugerem que quando múltiplas cópias do gene NS são carregados no vírion, uma resistência ao interferon pode ocorrer (PARDUE, 2000)

A saída eficiente da partícula viral da membrana celular requer, entre outras coisas, a atividade enzimática da neuraminidase para remover o ácido siálico da hemaglutinina. Isto previne a permanente adesão das proteínas e a agregação dos vírus na membrana celular (LAZARRI, 2004). Para as infecções LPAI, as partículas virais liberadas não são infecciosas até que a HA seja clivada entre as subunidades HA1 e HA2 pela tripsina ou enzimas *like-tripsina*.

6 - DOENÇA CLÍNICA

Estes vírus podem ser divididos entre os que causam infecções de mucosa do trato respiratório e/ou digestivo e as que causam infecção sistêmica. Os que causam infecção de mucosa são geralmente classificados como LPAI e estas infecções geralmente não causam grandes mortalidades, apesar das severas perdas de potencial zootécnico. Os vírus que causam infecção sistêmica geralmente causam alta mortalidade e são classificados como HPAI.

As vírus LPAI podem causar infecção assintomática mas os sintomas mais comuns são doença respiratória moderada a grave. Diminuição no consumo e ingestão de água e comida também é observado. Poedeiras e matrizes podem apresentar queda na postura e nunca mais retornar à produção esperada. Esta última condição tem sido descrita em criadores americanos de perus que criavam suínos na mesma propriedade (GARCIA, 1996). Pode haver uma mortalidade crescente conforme o vírus se espalha pelo lote. Grandes mortalidades podem ocorrer em surtos de LPAI associados a outros agentes oportunistas (BANO et al., 2003). A mortalidade pode variar de 0 a 100%.

Infecções com o vírus patogênico podem levar a morte súbita sem que a ave apresente qualquer sintomatologia. Em geral, os sinais respiratório são os mais observados, como tosse, sinusite, espirro e corrimento nasal, porém não são patognomônicos. Pode haver diarreia, desidratação, edema facial, sintomatologia nervosa, queda acentuada na produção de ovos e qualidade da casca comprometida. Barbelas aumentadas e cianóticas são um sinal bastante comum (ANDREATTI, 2007). As lesões variam de acordo com a patogenicidade do vírus e espécie afetada, podendo estar ausentes quando há morte súbita. De modo geral, ocorrem graus variados de congestão e hemorragia em diferentes órgãos.

7 - SURTOS PELO MUNDO

7.1. Estados Unidos da América

Nos EUA, diferentes estratégias foram desenvolvidas e utilizadas. Cada estratégia foi pensada para atingir um dos três objetivos: prevenir a introdução da influenza nas propriedades, minimizar as perdas econômicas decorrentes da doença clínica e total eliminação da influenza, principalmente das cepas HPAI. Estes objetivos são atingidos através de uma série de ações:

1. Biossegurança – procedimento para prevenir a entrada ou escape do vírus.
2. Diagnóstico e vigilância.
3. Eliminação de aves infectadas.
4. Diminuir a susceptibilidade ao vírus – vacinação ou linhagens resistentes.
5. Educação sanitária de todos os profissionais inseridos na cadeia.

Nos EUA, houveram três grandes surtos de HPAI até o ano de 2003. Em 1924 a doença, então chamada de peste aviária, surgiu em um mercado de aves vivas no nordeste do país, situação muito comum na Ásia e ainda culturalmente presente, em menor número, nos EUA. Em 1929 foi a vez da peste aviária atingir Nova Jersey e em 1983 a cepa HPAI N5H2 atingiu os estados da Pennsylvania, Maryland e Virginia (SWAYNE et al., 2003). Recentemente, desde de dezembro de 2014, tem sido relatados vários focos de HPAI cepas H5N8, H5N1 e H5N2, afetando esta última principalmente perus. Estes casos estão concentrados nos *'flyways'* – rotas migratórias – Pacífico, Central e do Mississippi.

Leis federais dão ao USDA – *United States Department of Agriculture* – o poder de declarar emergência sanitária, abater e destruir as carcaças, e pagar indenizações aos produtores (MYERS, 2006). Os programas de erradicação são conduzidos em cooperação com os estados. Todos os casos de HPAI são tratados visando a erradicação. Surtos LPAI de cepas H5 ou H7 são controlados ou, preferencialmente erradicados, para se evitar possíveis mutações para HPAI.

Antes de 1995, o uso de vacinas aprovadas pelo USDA requeriam apenas a decisão da indústria e a autorização dos estados, mas, a partir de 1996, é necessário a autorização federal para o uso de vacinas contra cepas H5 e H7 (MYERS, 2006). Atualmente, a legislação federal não abrange indenizações para cobrir surtos de H5 e H7 LPAI, embora existam situações excepcionais em que ocorrem o custeio da despopulação pelo governo. Em um surto de H7N2, em 2002, no estado da Virginia, se observou, através da vigilância, que houve uma mudança na sequência de aminoácidos no sítio de clivagem da hemaglutinina do vírus circulante, o que poderia levar a mudança de virulência para HPAI. O custo total do programa de erradicação federal foi cerca de \$81 milhões de dólares.

Em 2004, uma cepa H5N2 atingiu uma granja com cerca de 7 mil aves, no Texas. Esta granja fornecia os animais para mercados de aves vivas em todo estado. Como parte do plano de controle, o transito de animais e de pessoas foi restrito, foi formado uma 'zona infectada', com 8km e uma zona de vigilância, na qual todos os animais dentro de 16km ao redor da propriedade foram testados sorologicamente. Em uma ação voluntária, todos os cinco mercados que comercializavam com a granja tiveram seus animais abatidos e ambiente limpo e desinfetado (PELZEL et al., 2006).

O controle e erradicação de cepas H5 e H7 LPAI apresentam uma série de problemas nos EUA. Não há legislação federal própria sobre quais ações a serem tomadas nestes casos. É

difícil, em tempos de austeridade, reunir fundos necessários para o programa de erradicação, especialmente para as indenizações, neste país que já pode ser considerado uma região endêmica para LPAI.

7.2. Austrália

Surtos HPAI ocorreram em três estados australianos. Todas as propriedades acometidas tinham falhas graves na biossegurança. Provavelmente o vírus foi introduzido através de aves silvestres. Os últimos casos ocorreram em 2012 e 2013. Em 2012, uma criação *'free-range'* de 50 mil poedeiras foi acometida por uma cepa H7N7. A propriedade tinha grandes regiões alagadas que atraíam patos selvagens. No surto de 2013 uma cepa H7N2 atingiu uma propriedade de poedeiras *'free-range'* e em sistemas de gaiola com cerca de 400 mil animais. Em ambos os casos e em casos anteriores, a doença mostrou sintomatologia variada e comum a outras doenças, o que atrasou o diagnóstico de influenza.

O governo australiano conta com o Ausvetplan, uma série de manuais que guiam a assistência às emergências sanitárias e prove a estrutura e o manejo em casos de surtos de HPAI. Esta série é revisada regularmente devido as mudanças epidemiológicas bastante instáveis na região. A abordagem adotada nestes casos se baseia na destruição obrigatória de todos os animais acometidos no local e a eliminação dos animais expostos ao risco avaliada pelo serviço veterinário oficial. O abate sanitário dos animais se deu, nos casos citados a cima, por meio de dióxido de carbono em containers de aço. O uso da vacinação não é considerado, a menos que o surto envolva múltiplas propriedades em uma área com grande densidade de animais ou em situações em que o controle não possa se dar por eliminação das aves.

7.3. Chile

Em maio de 2002, produtores de ovos férteis de uma grande propriedade em San Antonio, Chile central, observaram sensível queda na produção de ovos, cerca de 10% e baixa mortalidade. O quadro foi diagnosticado como influenza H7N3 LPAI (ROJAS, 2002). Cerca de 20 dias após, a doença teve uma mudança brusca, causando mortalidade de 26% e cessando a produção de ovos (MAX et al., 2005). Uma semana após, um novo caso foi diagnosticado em uma fazenda de perus da mesma companhia, cerca de 4 quilômetros de distância do foco original. O Chile até então nunca havia tido nenhum caso de influenza aviária e a suspeita principal era de um caso de bronquite infecciosa.

Imediatamente após o diagnóstico, as duas propriedades foram postas em quarentena, com trânsito restrito. O governo chileno designou um considerável contingente de recursos para o caso, o que permitiu uma boa efetividade do programa, com vigilância, análise de risco, biossegurança e captação de dados. Foram destruídos 465 mil matrizes de frangos, 18.500 perus e 116 mil ovos férteis. Implantaram uma zona de infecção de 3km e outra de vigilância de 10km, em ambas as propriedades. Abate sanitário, limpeza, desinfecção e métodos de diagnóstico foram aceitos pela iniciativa privada. Com o apoio da OIE, o Chile foi declarado livre da influenza aviária 7 meses após a detecção do vírus.

8 - IMPORTANCIA DA VACINA

Vacinação raramente é usada como única ferramenta em um processo de erradicação. Na verdade, a única vez que isso de fato ocorreu foi na erradicação da varíola humana. Entretanto, a vacinação tem sido usada como uma importante ferramenta no controle de algumas doenças em alguns países e regiões do mundo, como no caso da febre aftosa e da brucelose na Austrália e nos Estados Unidos.

Uma boa vacina requer três características específicas. Primeiro, precisa diminuir ou prevenir a doença clínica. Segundo, precisa reduzir ou cessar a disseminação viral para o ambiente ou entre os indivíduos. Por último, a vacinação deve aumentar a resistência das aves em se tornar infectadas pelo vírus. Estas duas últimas características ajudam no controle e erradicação pois quebram o ciclo da infecção.

A vacina ideal preveniria completamente a infecção viral, situação chamada de imunidade esterilizante. Entretanto, a imunidade esterilizante dificilmente é obtida em uma vacina comercial e é bastante improvável conseguir isto em uma infecção via mucosa, como na influenza.

Há quatro metas na vacinação de influenza aviária para proteger as aves: a vacina deve prevenir a doença clínica, deve induzir a completa resistência a infecção após a exposição ao vírus, deve controlar e diminuir a replicação e excreção do vírus no ambiente e deve ser facilmente identificáveis os animais infectados pelo vírus em uma população vacinada. Entretanto, há poucos exemplos de vacinas comerciais que se enquadram nessas quatro características (LEE et al., 2005)

Múltiplos fatores afetam a proteção vacinal, incluindo:

1. Desafio de campo. Vacinas de boa qualidade protegem contra exposição a maior carga viral, enquanto as vacinas de pior qualidade apenas protegem contra baixas doses (SWAYNE et al., 1997)
2. O volume de HA na vacina inativada ou título na vacina viva. Grande volume de HA ou grandes títulos provem melhor proteção contra a replicação do vírus da influenza nos tratos respiratórios e digestivos, enquanto menores volumes podem proteger contra a morbidade e mortalidade, mas não contra a replicação e excreção do vírus (SWAYNE et al., 1999).
3. Adjuvantes. O uso de adjuvantes oleosos são comuns nas vacinas inativadas de aves, incluindo a da influenza, e seu uso produz uma longa e robusta resposta imune, mas requer duas ou mais doses para produzir uma imunidade de longo prazo (STONE, 1993)
4. Hemaglutinina. Quanto maior a similaridade genética entre a HA vacinal e a do vírus de campo, maior é a redução da replicação e excreção viral (SWAYNE, 2000).
5. Duração da proteção. As melhores vacinas produzem a proteção a partir dos sete a dez dias após a vacinação, com pico de imunidade entre três e quatro semanas e a proteção pode durar por seis a 12 meses. (SWAYNE et al., 1999) A duração da proteção está diretamente associada a quantidade de anticorpos produzidos durante a imunização.
6. Rota de administração. Vacinas com o vírus inativado e vacinas recombinantes (*recombinant fowl poxviruses* – rFPV) requerem administração parenteral, enquanto que algumas vacinas vivas podem ser administradas por vias de imunização em massa, como *spray* ou água.

7. Espécies de aves e número de vacinações. Frangos de corte, devido a seu ciclo relativamente curto podem ser protegidos por uma única aplicação durante sua vida inteira. Entretanto, perus e patos e aves de ciclos longos como poedeiras comerciais podem requerer múltiplas vacinações.
8. Idade da vacinação. A resposta de imunidade ótima com vacinas de influenza inativadas são conseguidas em sua maior parte em aves com duas semanas de vida ou pelo menos antes de atingir a puberdade.
9. Proteção vacinal versus proteção de laboratório. Resultados bons nos testes de laboratório nem sempre são alcançados no campo. Virose imunossupressoras, problemas na estocagem e transporte da vacina e programa vacinal incorreto são algumas das causas (SWAYNE, 2004).

9 - POSSÍVEIS REVESES DA VACINAÇÃO

A vacinação pode ter vários benefícios, mas também pode representar alguns sérios reveses. O primeiro é o custo da vacinação. Por causa do valor baixo das aves, a vacinação talvez seja considerada onerosa demais, se preconizaria, nesse cenário, primeiramente o abate sanitário dos lotes possivelmente infectados. As únicas vacinas disponíveis comercialmente para a influenza aviária são vacinas mortas com adjuvante oleoso ou vacinas recombinantes. As vacinas mortas são as mais utilizadas mundialmente e são tipicamente administradas através de injeção subcutânea, aumentando os custos (SUAREZ, 2005).

Outro grande impedimento é o comércio internacional. A vacinação é tradicionalmente usada no controle de doenças que não resultam em barreiras sanitárias. É justo que os países decidam sozinhos quais produtos apresentam uma ameaça ao seu *status* sanitário. Entretanto, muitos países utilizam a vacinação como justificativa para impor barreiras sanitárias, muitas vezes como forma de proteção de mercado interno. Esta justificativa deve ser embasada em fatos científicos. O país importador deve estar apto a mostrar, através de testes diagnósticos, que é livre do agente infeccioso ou que está em processo de controle ou erradicação da doença. Deve haver também evidências de que essa movimentação de animais ou de produtos animais seja realmente uma ameaça à sanidade nacional. No passado, a vacinação presumia a infecção prevalente no país exportador. Hoje, com a vacinação se tornando uma ferramenta mais aceitável no controle de enfermidades, estas barreiras precisam ser examinadas para se determinar se são ou não válidas para o comércio entre países (SUAREZ, 2005).

Um terceiro aspecto negativo da vacinação é o seu efeito na vigilância sorológica. A perda da sorologia é o maior desafio no uso da vacina no controle da influenza.

Outro grande impedimento seria o *drift* antigênico, que é uma acumulação de mutações pontuais no gene da hemaglutinina que resulta numa diminuição da proteção vacinal. Segundo Oxford (2003), *drift* antigênico é o resultado de mudanças no vírus de campo baseado na pressão imune do hospedeiro. Esta pressão de anticorpos pode ser pela infecção natural ou por vacinação, em ambos os casos o vírus estará sobre uma pressão de seleção para evitar o sistema imune. Ultimamente o *drift* antigênico não está sendo considerado um problema na influenza aviária, mas recentemente, algumas experiências com a vacinação de aves no México, El Salvador e Guatemala demonstraram que o *drift* antigênico pode ser um sério problema (LEE et al., 2004).

10 - ESTRATÉGIAS DIVA

O maior impedimento para a vacinação de influenza aviária é a perda do diagnóstico sorológico. Todos os animais vacinados apresentam altos títulos de anticorpos contra o vírus. Desta forma se retira a melhor ferramenta da vigilância sanitária. Estratégias DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*) são aquelas em que há a possibilidade de se diferenciar quais animais foram vacinados e quais foram infectados pelo vírus. Esta estratégia propõe resolver o problema da vacinação.

Vacinação contra LPAI e HPAI são comumente usadas em países que se tornaram endêmicos para o vírus da influenza aviária. Entretanto, políticas '*stamping-out*', de abate sanitário e erradicação são frequentes em países com a doença sob controle. O interesse em esquemas de vacinação DIVA como uma ferramenta de controle da influenza aviária tem crescido devido ao aumento de focos da doença em todo o mundo.

O conceito DIVA não é um conceito novo, este termo foi cunhado em 1999 como uma descrição alternativa mais refinada de uma vacina de marcação (VON OIRSCHOT, 1999) e já foi utilizado em outros programas antes, como por exemplo na erradicação da peste suína clássica e da doença de Aujeszky. No controle da pseudo-raiva suína, a vacina atenuada continha uma cepa do herpesvírus mutante com um gene, que codifica a proteína gC, deletado. Desta forma foi possível procurar sorologicamente por esta proteína nos rebanhos, encontrando a proteína, o animal necessariamente foi infectado.

Muitas estratégias DIVA tem sido propostas para o controle da influenza aviária. Mas todas elas possuem alguns elementos em comum. Todas estas vacinas necessariamente precisam expressar a HA viral. Os anticorpos contra esta proteína são os que provem a melhor proteção, embora anticorpos contra outras proteínas virais, como a NA também ajudem, mas em menor proporção. No caso da influenza aviária, principalmente no campo, nenhuma vacina produz a imunidade esterilizante quando expostas a grande desafio viral. Entretanto, animais vacinados terão maior resistência a infecção e vão requerer maior dose viral para desenvolver a infecção, quando comparado a animais não vacinados.

Todas estas vacinas requerem um teste de diagnóstico sensível, específico e de baixo custo, de forma que possa ser utilizado em grandes números de amostras. A maioria dos pesquisadores utilizou testes ELISA.

Um desafio a esta estratégia é diferenciar não apenas os vacinados dos infectados mas também segregar os animais vacinados que se tornaram infectados. Alcançar este ponto é muito benéfico em facilitar o comércio de exportação.

10.1. Sentinelas

O uso de aves não vacinadas em um lote de animais vacinados pode servir como indicador da circulação viral. Esta é uma estratégia comumente utilizada em diversos países, incluindo Itália (CAPUA et al., 2006) e França. Sua principal desvantagem é o manejo destas aves, que devem ser devidamente marcadas e facilmente identificadas. Também há a

preocupação que estas aves possam se infectar e aumentar a carga viral do ambiente, aumentando o risco de infecção no local.

O uso de sentinelas está descrito no Plano de Contingência para Influenza Aviária e Doença de New Castle, do Ministério da Agricultura, como possível ação a ser tomada pelo Serviço Veterinário Oficial em casos confirmados de influenza. Neste caso, o Plano descreve a introdução de sentinelas 72 horas após a desinfecção do galpão com o objetivo de estabelecer a realização de um controle sorológico e virológico neste local. Os testes são feitos a cada 7 dias, até completar 21 dias. Estas aves são confinadas a um determinado espaço e diariamente são movidas cerca de 10 metros, de modo que as aves, após 21 dias, tenham se movimentado por todo o galpão.

10.2. Vacinas de Subunidade

Uma vacina de subunidade contém proteínas virais, mas não possui ácidos nucleicos virais. Devido aos anticorpos contra hemaglutinina e neuraminidase proverem a proteção primária contra a influenza, é possível utilizar utilizar uma vacina com apenas essas duas proteínas (SUAREZ, 2005). Desta forma, se produz uma resposta imune focada. Esta vacina compreende pelo menos uma das proteínas virais, principalmente a hemaglutinina, antígeno que permite a adesão do vírus à membrana celular. Diversos estudos corroboram esta afirmação. Liu (2003), utilizou um baculovirus para a expressão de uma hemaglutinina H5N1 HPAI e induziu uma grande resposta de anticorpos, evitando a doença clínica e providototal proteção nas aves. Crawford (1999), realizou trabalho semelhante e obteve os mesmos resultados. Wu (2009), também utilizou um baculovirus para a expressão de hemaglutinina de vírus H5 e H7. Estas proteínas purificadas protegeram aves SPF (livres de patógenos específicos) vacinadas e, quando desafiadas com o vírus homólogo, cessaram ou diminuíram a disseminação viral.

Muitos tipos diferentes de vacinas de subunidades, incluindo vírus vetoriados e vacinas usando proteínas expressadas em diferentes meios de cultura já demonstraram proteção contra o desafio de HPAI. Entretanto, apenas a vacina recombinante do vírus vetoriado da bouba aviária para o subtipo H5 está disponível comercialmente (LEE et al., 2005). Esta vacina contém a hemaglutinina H5 do vírus A/Turkey/Ireland/83 e experimentalmente já demonstrou proteger muitas HPAI (TAYLOR, 1988). Esta vacina foi licenciada pelo nos Estado Unidos, mas nunca usada neste país. Entretanto tem sido usada frequentemente no México, Guatemala e El Salvador.

Recentemente, Lee (2011) propôs um modelo de vacinação contra H9N2 utilizando apenas HA e a proteína M1 desta cepa. Esta vacina demonstrou ser razoavelmente eficaz no controle da doença quando aves SPF imunizadas foram desafiadas com o vírus. Embora a vacina comercial obtivesse melhores resultados, a vacina de subunidade testada permitiu a diferenciação dos vacinados através do monitoramento sorológico da resposta imune à nucleoproteína, utilizando um teste simples de ELISA.

Este tipo de vacina, diminuem as preocupações com biosseguridade, quando comparado a vacinas vivas atenuadas ou vacinas inativadas. Por exemplo, existe a forte suspeita que a cepa HPAI H5N2 americana tenha se introduzido no Japão através de vacinas com o vírus não corretamente inativado ou por contaminação na vacina (LEE, 2011)

As vacinas de subunidades tem algumas desvantagens, principalmente para as vacinas vivas vetorizadas, que é a regulação dos órgãos responsáveis. A licença para este tipo de vacina é mais difícil devido as preocupações sobre a infecção de outras espécies, fuga e difusão do vírus. A vacina recombinante da bouba aviária não teve este problema, pois este vírus não se espalha facilmente com o contato entre as aves. Outra dificuldade para este tipo de vacina é a resistência do consumidor ao uso de organismos modificados geneticamente, especialmente na Europa. Por último, a principal dificuldade deste tipo de vacina é má sensibilidade em diferenciar as aves que de fato tiveram contato com o vírus de campo. As aves infectadas com o vírus de campo podem não ter replicação viral o suficiente para estimular uma resposta de anticorpos e assim não irão soroconverter ou soroconverter em baixos níveis (SUAREZ, 2005).

10.3. Neuraminidase Heteróloga

O vírus da influenza é um vírus de RNA segmentado, que codifica 10 proteínas diferentes, incluindo duas glicoproteínas de membrana – hemaglutinina e neuraminidase. Existem 16 subtipos de hemaglutinina e 9 de neuraminidase, que são sorologicamente distintas. Estas duas proteínas, teoricamente, podem ocorrer em 144 diferentes combinações. Entretanto, algumas combinações parecem ser mais comuns e ocorrem com maior frequência que outras – H5N2, por exemplo. Apesar de ambos anticorpos, contra hemaglutinina e contra neuraminidase, serem importantes na proteção do organismo, anticorpos contra a primeira são os mais importantes e vacinas com uma neuraminidase heteróloga podem ser usadas com grande efetividade (PEETER, 2012).

Esta estratégia DIVA é baseada no uso de uma vacina em emulsão oleosa contendo a mesma hemaglutinina que o vírus de campo, porém com uma neuraminidase diferente. Desta forma se permite a possibilidade de uma estratégia DIVA baseada na sorologia focada na neuraminidase. Por exemplo, se a cepa viral circulante no campo é um H7N2, podemos vacinar com H7N3, ou sete outras combinações. Monitoramento sorológico na proteína N3 pode confirmar que o lote foi vacinado e monitoramento sorológico na proteína N2 pode monitorar a infecção com o vírus de campo. Desta forma podemos identificar as aves que foram vacinadas e se infectaram com o vírus de campo (SUAREZ, 2005).

CAPUA et al. (2006), utilizou uma vacina inativada contendo a cepa A/ck/Pakistan/95 (H7N3) em aves desafiadas com a cepa HPAI A/ty/Italy/4580/V99 (H7N1). Esta vacina induziu proteção clínica em 93% dos esquemas de vacinação utilizados – vacinação dupla as duas e quatro semanas de vida ou vacinação única na terceira semana – e preveniu a viremia em aves SPF. Também se constatou que haviam menos aves vacinadas excretando o vírus, quando comparadas as aves não vacinadas expostas ao vírus. Esta última informação corrobora com os resultados obtidos por Swayne (1999).

Neste mesmo trabalho, foi realizado o desenvolvimento e validação de um teste ‘*ad hoc*’ de detecção de anticorpo contra N1, para ser usado como teste de rotina. Este teste consistiu em um ensaio de imunofluorescência indireto (iIFAT) e seus resultados concordaram com o teste de inibição da hemaglutinação feito nas mesmas aves. A sensibilidade e especificidade do teste foram calculados em 98,1% e 95,7% respectivamente. Estes resultados são bastante satisfatórios para a identificação de H7N1 independentemente de sua vacinação com H7N3. Deve ser lembrado que o iIFAT é demorado, trabalhoso e a subjetividade no julgamento do operador pode levar a interpretações equivocadas (CAPUA, 2006).

A estratégia de NA heteróloga pode ser aplicada no controle de HPAI ou LPAI, em países ou regiões em que apresentem apenas uma cepa viral circulante. Entretanto esta estratégia requer as cepas certas, o que pode dificultar muito a sua implantação, principalmente em países que possuem sistema de epidemiologia menos desenvolvidos.

10.4. NS1

A proteína NS1 não é encontrada na partícula viral, mas é produzida em grande escala pela célula hospedeira (CONNOR, 1994). Esta proteína é sintetizada logo após a infecção e provavelmente atua inibindo a defesa antiviral do hospedeiro mediada pelo interferon alfa e beta (GARCI et al., 1998).

Uma estratégia DIVA que tem sido discutida é sorologia focada na resposta imune sobre a proteína não estrutural 1 (NS1). Esta proteína é produzida em grande quantidade nas células infectadas porém não é carregada na partícula viral. Vacinas inativadas são partículas virais mortas, logo, teoricamente em aves vacinadas não haveria resposta imune a esta proteína, enquanto que em animais naturalmente infectados se desenvolveriam anticorpos contra a NS1. Esta abordagem já foi demonstrada em equinos utilizando um teste ELISA (BIRCH-MACHIN et al., 1997).

Entretanto, vacinas comerciais são produzidas em fluido alantoide de ovos embrionados e são apenas parcialmente purificadas. Estas vacinas contem pequenas quantidades desta proteína como contaminante de células lisadas pelo vírus no embrião e aves vacinadas podem desenvolver anticorpos contra esta proteína, especialmente se houver mais de uma vacinação. Esta pequena quantidade de anticorpos contra NS1 pode dificultar o seu uso como DIVA, entretanto, aves infectadas possuem maior nível desses anticorpos (SUAREZ, 2005). No caso equino mencionado acima, foi utilizada uma vacina inativada com o vírus inteiro, mas purificada, e foi removida toda proteína residual NS1 que poderia estar presente no meio.

Tumpei (2005), detectou, no soro de aves imunizadas com vacinas comerciais, uma fraca, porém presente, reatividade a proteína NS1 através de teste ELISA e Western blot. Em contraste com as vacinas comerciais, os soros de aves que receberam vacinas purificadas não tiveram níveis detectáveis de anticorpos de NS1, mesmo após três imunizações, quando apresentaram níveis altos de anticorpos contra outras proteínas virais.

O autor realizou uma diluição seriada dos soros das aves e, utilizando um segundo teste ELISA, chegou a uma diluição ótima na qual, mesmo com vacinas convencionais, seria possível detectar anticorpos contra NS1 apenas em animais infectados. Os resultados deste estudo indicam que usando um simples teste ELISA pode se diferenciar animais vacinados de infectados. Entretanto, este trabalho sozinho não pode ser utilizado como base para um programa de controle, mas sim para estudos posteriores.

A grande vantagem da estratégia DIVA NS1 sobre a estratégia da neuraminidase heteróloga é a habilidade de usar um único teste sorológico para todas as vacinas inativadas. Além disso, com essa estratégia, pode se utilizar HA e NA específica para o vírus de campo, aumentando a chance de proteção. A desvantagem seria o potencial de contaminação da NS1 na vacina, que poderia afetar os resultados (SUAREZ, 2005).

Existem pesquisas, na medicina humana, que sugerem a produção de vírus recombinantes com a proteína NS1 defeituosa ou ausente, e através dele produzir uma vacina (TALON, 2000). Esta vacina recombinante não possuiria epítopos na NS1, permitindo assim a clara distinção entre vacinados e infectados.

10.5. Marcadores Exógenos

Outras linhas de pesquisa trabalham com marcadores vacinais exógenos. James (2007), propôs um modelo de marcador vacinal baseado na administração de toxóide tetânico (TT) junto ao adjuvante oleoso. Foi averiguado que 100% de quase duas mil aves, na Austrália, China e Hong Kong, não possuíam anticorpos contra o toxóide. O TT é, quando administrado em conjunto com o adjuvante oleoso, altamente imunogênico nas aves, persistindo por 53 semanas pós vacinação. Desta forma, se configurou um modelo no qual o antígeno vacinal e o TT são administrados na mesma vacina. Uma ave vacinada necessariamente deverá apresentar anticorpos para ambos IA e TT. Neste experimento se utilizou a cepa H6N2, mas, teoricamente, qualquer outra cepa poderia ser usada. O autor sugere que este método também pode ser implementado em outras doenças como Newcastle e gumboro. O autor argumenta que políticas de erradicação, de abate sanitário de todos os lotes positivos são sócio e economicamente inaceitáveis e desnecessários, sendo a preferência a vacinação profilática. Obviamente, isto se encaixa no contexto asiático, onde a IA é endêmica. De forma alguma isso se aplica ao Brasil, que nunca teve nenhum caso e, caso haja, deve proceder imediatamente visando a erradicação.

11 - DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS

É muito difícil prever os danos causados por um surto de influenza aviária no Brasil, mas podemos afirmar que seria, no mínimo, catastrófico. As exportações seriam imediatamente canceladas e, na melhor das hipóteses, mesmo com o foco controlado, ainda levaria algum tempo para serem retomadas, gerando severas perdas. Fachinello (2008) estimou que a rejeição ao consumo a carne de frango e ovos em caso de um surto de influenza aviária no país chegaria a 66%. Isto é alarmante quando se percebe que cerca de 75% da produção de frango é consumida pelo mercado interno.

Políticas '*stamping-out*' de erradicação através da eutanásia de animais infectados e dos expostos ao risco tem sido uma boa ferramenta, mas vem com um grande custo econômico e social. Seus princípios são claros: diagnosticar quando a doença foi introduzida no país ou em uma região, identificar as propriedades acometidas e destruir todas as aves acometidas e as que possam ter sido expostas ao agente. É uma estratégia confiável e é usada no controle de enfermidades há mais de 2000 anos (BLANCOU, 2003). Há o abate não apenas das aves acometidas mas também de todas as aves susceptíveis em um raio pré-determinado. Esta área seria uma área de garantia, na qual se abateriam os animais que poderiam se contaminar através de fômites, equipamentos, pessoas. O resultado é o abate de milhares de aves saudáveis.

Utilizar uma política de erradicação baseada no abate sanitário ou o uso de medidas de controle que podem incluir a vacinação é uma decisão que deve considerar múltiplos fatores: quantos locais possuem aves infectadas, o quão distribuídas estão estas propriedades, a efetividade e força do serviço veterinário oficial, a infraestrutura, o impacto comercial, a disponibilidade de vacinas apropriadas e de fundos para a indenização dos produtores, etc.

Pratt&Falconi (2007) desenvolveram, utilizando diversos parâmetros e metodologias, um índice de prontidão para um surto de HPAI na América Latina. Segundo este índice, o Brasil é o segundo país mais bem preparado para um surto, ficando atrás apenas do Chile. O pior índice se deu pela falta de estruturação de laboratórios de referência regionais.

De acordo com a legislação e as instruções normativas do Ministério da Agricultura, que são signatários da OIE, na presença de um foco de influenza aviária, deve-se implantar a interdição imediata da propriedade, abate sanitário e descarte adequado dos animais e da cama do aviário. Caso o programa de controle e erradicação falhe e o agente se espalhe, a vacinação poderia ser utilizada no controle. Isto ocorreria apenas como último recurso. Neste caso a legislação preconiza a vacinação com mecanismos DIVA, entretanto a forma de aquisição e quais vacinas ainda não foi descrito. No Brasil não existem vacinas registradas no MAPA e o seu uso é proibido.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, D. J.; SPACKMAN, D. Characterisation of influenza A viruses isolated from turkeys in England during March-May 1979. **Avian Pathology**, v. 10, n. 3, p. 281-293, 1981.

ALEXANDER, Dennis J.; CAPUA, Ilaria; KOCH, Guus. Highly pathogenic avian influenza outbreaks in Europe, Asia, and Africa since 1959, excluding the Asian H5N1 virus outbreaks. **Avian influenza**, v. 1, p. 217-237, 2008.

ANDREATTI FILHO, Raphael Lucio. **Saúde aviária e doenças**. Editora Roca, 2007.

BAKAR, Abu et al. Avian influenza: Global assessment of potential pandemic of the twenty first century. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 17, n. 2, p. 10-19, 2009.

BANO, S.; NAEEM, K.; MALIK, S. A. Evaluation of pathogenic potential of avian influenza virus serotype H9N2 in chickens. **Avian diseases**, v. 47, n. s3, p. 817-822, 2003.

BARR, D. A. et al. Avian influenza on a multi-age chicken farm. **Australian veterinary journal**, v. 63, n. 6, p. 195-196, 1986.

BIRCH-MACHIN, Ian et al. Expression of the nonstructural protein NS1 of equine influenza A virus: detection of anti-NS1 antibody in post infection equine sera. **Journal of virological methods**, v. 65, n. 2, p. 255-263, 1997.

BLANCOU, J. History of the surveillance and control of transmissible animal diseases. Office Internationale des Epizooties. 2003.

BROWN, I. H. et al. Recent epidemiology and ecology of influenza A viruses in avian species in Europe and the Middle East. **Developments in biologicals**, v. 124, p. 45-50, 2005.

CAPUA, Ilaria; ALEXANDER, Dennis J. Avian influenza: recent developments. **Avian Pathology**, v. 33, n. 4, p. 393-404, 2004.

CAPUA, Ilaria; MARANGON, Stefano. Control of avian influenza in poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 9, p. 1319, 2006.

COLVILLE, Joann; BERRYHILL, David. **Handbook of zoonoses: identification and prevention**. Elsevier Health Sciences, 2007.

CONNOR, Robert J. et al. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 17-23, 1994.

CRAWFORD, John et al. Baculovirus-derived hemagglutinin vaccines protect against lethal influenza infections by avian H5 and H7 subtypes. **Vaccine**, v. 17, n. 18, p. 2265-2274, 1999.

FACHINELLO, Arlei Luiz. **Avaliação do impacto econômico de possíveis surtos da gripe aviária no Brasil: uma análise de equilíbrio geral computável**. 2008. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

GARCÍ, Adolfo et al. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. **Virology**, v. 252, n. 2, p. 324-330, 1998.

GARCÍA, Maricarmen et al. Heterogeneity in the haemagglutinin gene and emergence of the highly pathogenic phenotype among recent H5N2 avian influenza viruses from Mexico. **Journal of General Virology**, v. 77, n. 7, p. 1493-1504, 1996.

GLOBIG, A. et al. Epidemiological and ornithological aspects of outbreaks of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 of Asian lineage in wild birds in Germany, 2006 and 2007. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 56, n. 3, p. 57-72, 2009.

HIRST, Martin et al. Novel avian influenza H7N3 strain outbreak, British Columbia. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 12, p. 2192, 2004.

JAMES, Cassandra M. et al. Use of tetanus toxoid as a differentiating infected from vaccinated animals (DIVA) strategy for sero-surveillance of avian influenza virus vaccination in poultry. **Vaccine**, v. 25, n. 31, p. 5892-5901, 2007.

KAWAOKA, Y. et al., Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks? **Virology**, v.163, n.3, p.247. 1988

KIM, C.S. **Highly pathogenic avian influenza**. Republic of Korea. 2006. Disponível em: <http://www.oie.int/wahid-rod/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=4514> Acesso em: 15 mar. 2015.

LAZZARI, Stefano; STÖHR, Klaus. Avian influenza and influenza pandemics. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 82, n. 4, p. 242-242, 2004.

LEE, Chang-Won; SUAREZ, David L. Avian influenza virus: prospects for prevention and control by vaccination. **Animal health research reviews**, v. 6, n. 01, p. 1-15, 2005.

LEE, Dong-Hun et al. H9N2 avian influenza virus-like particle vaccine provides protective immunity and a strategy for the differentiation of infected from vaccinated animals. **Vaccine**, v. 29, n. 23, p. 4003-4007, 2011.

LIU, Guangliang et al. A subunit vaccine candidate derived from a classic H5N1 avian influenza virus in China protects fowls and BALB/c mice from lethal challenge. **Vaccine**, v. 31, n. 46, p. 5398-5404, 2013.

LIU, Jinhua et al. Highly pathogenic H5N1 influenza virus infection in migratory birds. **Science**, v. 309, n. 5738, p. 1206-1206, 2005.

MACARI, M. Doença das aves. 2000.

MAX, Vanessa et al. Avian influenza in Chile: a successful experience. **Avian diseases**, v. 51, n. s1, p. 363-365, 2007.

MCNULTY, M. S. et al. Isolation of a highly pathogenic influenza virus from turkeys. **Avian Pathology**, v. 14, n. 1, p. 173-176, 1985.

MYERS, Kendall P. et al. Are swine workers in the United States at increased risk of infection with zoonotic influenza virus?. **Clinical infectious diseases**, v. 42, n. 1, p. 14-20, 2006.

OXFORD, J. O. H. N. et al. Influenza—the chameleon virus. In: **Antigenic variation**. Academic Press Amsterdam, 2003.

PALESE, P.; SHAW, M. L. Fields virology. **Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication**, 5th edn, Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, Wolters Kluwer Business, p. 1647-1689, 2007.

PEETERS, Ben et al. New DIVA vaccine for the protection of poultry against H5 highly pathogenic avian influenza viruses irrespective of the N-subtype. **Vaccine**, v. 30, n. 49, p. 7078-7083, 2012.

PELZEL, Angela M.; MCCLUSKEY, Brian J.; SCOTT, Aaron E. Review of the highly pathogenic avian influenza outbreak in Texas, 2004. **JOURNAL-AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION**, v. 228, n. 12, p. 1869, 2006.

PERDUE, Michael L. et al. Avian influenza in the 1990s. **Poultry and avian biology reviews**, v. 11, n. 1, p. 1-20, 2000.

PRATT, Alejandro Nin; FALCONI, César. Potential Economic Impact of Avian Influenza on the Latin American and Caribbean Poultry Sector. **Publication of the Inter-American Development Bank**, 2007.

ROJAS, Hernan et al. Avian influenza in poultry in Chile. **Veterinary Record**, v. 151, n. 6, p. 188-188, 2002.

SENNE, D. A. et al. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. **Avian diseases**, p. 425-437, 1996.

SLEMONS, Richard D. et al. Type-A influenza viruses isolated from wild free-flying ducks in California. **Avian diseases**, p. 119-124, 1974.

SLEMONS, Richard D.; SWAYNE, David E. Using mean infectious dose of high-and low-pathogenicity avian influenza viruses originating from wild duck and poultry as one measure of infectivity and adaptation to poultry. **Avian diseases**, v. 52, n. 3, p. 455-460, 2008.

STALLKNECHT, D. E. et al. Avian influenza viruses from migratory and resident ducks of coastal Louisiana. **Avian diseases**, p. 398-405, 1990.

STALLKNECHT, D. E.; SHANE, S. M. Host range of avian influenza virus in free-living birds. **Veterinary research communications**, v. 12, n. 2-3, p. 125-141, 1988.

STONE, Henry D. Efficacy of experimental animal and vegetable oil-emulsion vaccines for Newcastle disease and avian influenza. **Avian diseases**, p. 399-405, 1993.

SUAREZ, David L. Overview of avian influenza DIVA test strategies. **Biologicals**, v. 33, n. 4, p. 221-226, 2005.

SWAYNE, D. E. Application of new vaccine technologies for the control of transboundary diseases. **Developments in biologicals**, v. 119, p. 219-228, 2003.

SWAYNE, D. E. et al. Acute renal failure as the cause of death in chickens following intravenous inoculation with avian influenza virus A/chicken/Alabama/7395/75 (H4N8). **Avian diseases**, p. 151-157, 1994.

SWAYNE, D. E. et al. Influence of virus strain and antigen mass on efficacy of H5 avian influenza inactivated vaccines. **Avian Pathology**, v. 28, n. 3, p. 245-255, 1999.

SWAYNE, D. E.; AKEY, B. L. Avian influenza control strategies in the United States of America. **Frontis**, v. 8, p. 113-130, 2005.

SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L. Highly pathogenic avian influenza. **Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties**, v. 19, n. 2, p. 463-475, 2000.

SWAYNE, David E. (Ed.). **Avian influenza**. John Wiley & Sons, 2009.

SWAYNE, David E. Epidemiology of avian influenza in agricultural and other man-made systems. **Avian influenza**, p. 59-85, 2008.

Swayne, David E., et al. "Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 avian influenza hemagglutinin gene insert." *Vaccine*18.11 (2000): 1088-1095.

Swayne, David E., Joan R. Beck, and Thomas R. Mickle. "Efficacy of recombinant fowl poxvirus vaccine in protecting chickens against a highly pathogenic Mexican-origin H5N2 avian influenza virus." *Avian diseases*(1997): 910-922.

TALON, Julie et al. Influenza A and B viruses expressing altered NS1 proteins: a vaccine approach. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 8, p. 4309-4314, 2000.

TAYLOR, Jill et al. Protective immunity against avian influenza induced by a fowlpox virus recombinant. **Vaccine**, v. 6, n. 6, p. 504-508, 1988.

TRACEY, John P. et al. The role of wild birds in the transmission of avian influenza for Australia: an ecological perspective. **Emu**, v. 104, n. 2, p. 109-124, 2004.

TUMPEY, Terrence M. et al. Diagnostic approach for differentiating infected from vaccinated poultry on the basis of antibodies to NS1, the nonstructural protein of influenza A virus. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 2, p. 676-683, 2005.

VAN OIRSCHOT, J. T. Diva vaccines that reduce virus transmission. **Journal of biotechnology**, v. 73, n. 2, p. 195-205, 1999.

VILLAREAL, C. L.; FLORES, A. O. The Mexican avian influenza (H5N2) outbreak. **Avian Diseases**, p. 18-22, 2003.