

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Inquérito epidemiológico de doenças respiratórias em aves de subsistência e modelagem
de espalhamento de influenza aviária no Rio Grande do Sul**

FERNANDA SIMONE MARKS

Porto Alegre, março de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Inquérito epidemiológico de doenças respiratórias em aves de subsistência e modelagem
de espalhamento de influenza aviária no Rio Grande do Sul**

FERNANDA SIMONE MARKS

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias, na área de concentração Epidemiologia.

Orientador: **Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini**

Porto Alegre, março de 2014.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernanda Simone Marks

Título: Inquérito epidemiológico de doenças respiratórias em aves de subsistência e modelagem de espalhamento de influenza aviária no Rio Grande do Sul

Aprovada em 31 de março de 2014, por:

Prof. Dr. Luís Gustavo Corbellini
Orientador e Presidente da Comissão

Dra. Eliana Ottati Nogueira Dantas (Bayer Healthcare)
Membro da Comissão

Profa. Dra. Débora da Cruz Payão Pellegrini (UNIPAMPA)
Membro da Comissão

Prof. Dr. Cláudio Estevão Farias da Cruz (UFRGS)
Membro da Comissão

DEDICATÓRIA

“Quando a solidão apertar, olhe pro lado, olhe pro lado...que eu estarei por lá”. Desde a primeira vez que ouvi isso nunca mais foi diferente, e não só quando a solidão apertava, mas em todos os momentos que olhei para o lado. Este trabalho é dedicado ao meu grande amor, amigo e companheiro José por estar sempre ao meu lado, me apoiando, incentivando, aconselhando, estimulando, divertindo e nunca deixando que os obstáculos do caminho me derrubassem.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Luís Gustavo Corbellini, pela oportunidade de realizar este trabalho e pela orientação.

À pesquisadora Liana Brentano, da Embrapa Suínos e Aves, pelas orientações, discussões e valiosas sugestões, e pela disponibilização do uso de seu laboratório para execução deste trabalho.

Ao professor Marcos Amaku, USP, pelas orientações, ensinamentos, idéias, apoio técnico e científico, e tempo dedicado as discussões do meu trabalho.

Aos integrantes da comissão avaliadora, doutores Cláudio Cruz, Eliana Dantas e Débora Pellegrini pelo aceite do convite e revisão da tese.

Aos colegas de trabalho de campo, Carla Rodenbusch, Eduardo Costa e Héber Hein por toda ajuda técnica e científica, discussões e companhia agradável e divertida.

À analista Cíntia Okino, Embrapa Suínos e Aves, pelo auxílio laboratorial, pelas discussões e ensinamentos, e pela amizade.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística (LEB) da USP, Raul Ossada, José Grisi-Filho e Fernando Marques, pela grande colaboração no trabalho, convivência e apoio nas atividades que realizei no LEB. Em especial ao Raul, pelo tempo e atenção dedicados integralmente ao meu trabalho, e pelas discussões.

À Inspeção Veterinária de Mostardas, em especial à Médica Veterinária Neiva Terra, e ao Sr. João, essenciais na execução do trabalho de campo.

À Secretaria da Agricultura, Pecuária e Agronegócio do RS, em especial aos Médicos Veterinários Flávio Loureiro, Diego Viali e Flávia Fortes pela colaboração no planejamento do trabalho.

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em especial ao Bernardo Todeschini e Taís Bernarque pela colaboração no planejamento do trabalho.

À população de Mostardas e Tavares, pela concordância e acolhida ao nosso trabalho, gentil recepção em suas casas, e por permitirem as coletas de amostras de suas aves.

À equipe dos Laboratórios de Bioquímica Farmacológica (Cbiot/UFRGS), de Parasitologia (IPVDF) e de Virologia (Favet/UFRGS), pela disponibilização do uso dos seus laboratórios e equipamentos para execução de alguns dos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Veterinária (Epilab), Gustavo Machado, Eduardo Costa, Héber Hein e Waldemir Santiago, pela colaboração no trabalho, amizade, convivência e discussões, e pela acolhida no grupo.

Ao CNPq e à Capes, pelos recursos financeiros fornecidos ao projeto e na forma de bolsa de estudos.

A todos (professores e colegas) que fizeram parte e colaboraram de alguma forma para minha formação.

À UNIBAVE, pela oportunidade da experiência da docência.

Aos grandes e especiais amigos Carla Rodenbusch e Thiago da Cruz, por todos os momentos de diversão, conversas intermináveis e eterno apoio, e por permitirem que fizéssemos parte de suas vidas e da do Iago. À Carla, pelas discussões e sugestões científicas.

Às amigas Laura Lopes e Edna Sanches, pelas pessoas especiais e profissionais exemplares, pela amizade, pelos momentos de diversão, pelos conselhos e discussões profissionais e pessoais. Particularmente à Edna, por estar ao meu lado em um dos momentos profissionais mais difíceis.

À grande amiga Marisa Macagnan, pela amizade, convivência agradável, e conselhos, e por me acolher em sua casa, permitindo a execução de parte deste trabalho.

À amiga Clarissa Vaz, pelos ensinamentos e conselhos, e por estar sempre disponível a ajudar.

Aos meus pais (Marilene e Carlos), pelo apoio e suporte emocional, confiança, esforço, torcida e amor para que eu pudesse realizar com sucesso meus objetivos.

Aos meus sogros (Nídia e José), pela preocupação constante com minha vida pessoal e profissional. Pelo apoio no momento manauara das nossas vidas!

Ao José, meu maior exemplo profissional e pessoal, pela amizade, amor, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos e por fazê-los mais agradáveis e divertidos, pelas discussões e sugestões científicas, por sempre me incentivar e me auxiliar em tudo, e pela ajuda essencial neste trabalho.

Aos meus amados filhotes, Polho, Fiona, Bona, Babesia e Flor, pelas constantes e sinceras demonstrações de amor e carinho, e por fazerem meus dias mais felizes.

A Deus, por todas essas pessoas maravilhosas que fazem parte da minha vida e por tudo que consegui conquistar.

RESUMO

Patógenos associados a aves migratórias podem causar doenças em aves domésticas. As aves de subsistência são possíveis fontes de disseminação destes patógenos pela ausência de biossegurança na criação e pelo contato com aves silvestres. A região do Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP), no Rio Grande do Sul, se caracteriza como um importante sítio de aves migratórias. Devido a isto, é possível uma interface entre aves migratórias e aves de subsistência criadas na região. A influenza aviária (AI) é a principal doença associada a aves migratórias que afeta o sistema respiratório, sendo estas os principais disseminadores do vírus. Estudos prévios indicam que há risco de introdução de um vírus de AI de alta patogenicidade (HPAIV) na região. Porém, o padrão e impacto do espalhamento deste patógeno na região é desconhecido, visto a ausência de relatos. Cabe ressaltar que outras enfermidades respiratórias, como a Doença de Newcastle (ND) e a micoplasmose por *Mycoplasma gallisepticum* (MG), também são associadas a aves migratórias e podem causar doenças em aves domésticas. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é realizar um inquérito epidemiológico de doenças respiratórias associadas a aves migratórias em aves de subsistência e propor um modelo de espalhamento de HPAIV na região do PNL. Com esta finalidade, realizamos uma avaliação (i) da presença de anticorpos contra AI, ND e MG nas aves de subsistência por ELISA, (ii) da presença dos agentes de AI e ND por RT-PCR em tempo real nas aves de subsistência, (iii) dos possíveis fatores de risco associados aos patógenos e (iv) das consequências da introdução de HPAIV na região através de um modelo matemático de espalhamento. Nas propriedades de aves de subsistência amostradas da região, foi detectada a presença de anticorpos contra AI, ND e MG na frequência de 4,2%, 87,5% e 58,3%, respectivamente. Todas as amostras foram negativas no RT-PCR em tempo real realizado para AI e ND. A avaliação de fatores de risco foi possível nas propriedades

soropositivas para ND e MG, possibilitando realizar-se a primeira análise de fatores de risco para estes agentes em aves de subsistência no Brasil. Para ND, o risco foi maior nas propriedades nas quais os criadores adotam a prática de reposição própria para manter a criação (PR=1,64; 95% IC: 1,11 – 2,42). Além disso, o aumento na distância das granjas em relação ao estuário da Laguna do Peixe diminui o risco para ND (PR=0,94; 95% IC: 0,90 – 0,99). Já para MG, foram considerados fatores de risco a prática de confinar as aves (PR = 3,40, 95% IC: 1,93 – 5,99) e a interação entre a “troca de aves ou ovos com outros produtores e vizinhos possuem aves” (PR = 2,16, 95% IC: 1,24 – 3,76). Nas simulações da modelagem matemática de espalhamento de HPAIV na região, a maioria das propriedades se tornaria infectada até o 30º dia de infecção. Além disso, na média das simulações, a infecção atingiria em torno de 80 a 90% das propriedades, alcançando até 30 km de distância do caso índice. Os resultados indicam a circulação de patógenos associados a aves migratórias na região do PNLP. Devido à detecção destes nas aves de subsistência, estas podem ser consideradas sentinelas destes agentes na região. Além disso, os dados obtidos incrementam o conhecimento sobre o espalhamento e a dinâmica dessas doenças em propriedades com aves de subsistência, bem como sobre os indicadores de risco para ocorrência. Estes dados podem ser utilizados para o estabelecimento de medidas de biossegurança e de manejo adequados para este tipo de criação e de programas de monitoria visando à contenção da disseminação de patógenos.

ABSTRACT

Pathogens associated with migratory birds can cause disease in domestic birds. Backyard poultry are possible source of pathogens dissemination due to the lack of biosecurity measures and the contact with wild birds. The region of Lagoa do Peixe National Park (PNLP), in Rio Grande do Sul state, Brazil, is characterized as an important site for migratory birds. Thus, it is a possible interface place for migratory and backyard birds. Avian influenza (AI) is the most important respiratory disease associated with migratory birds, the main virus disseminating agents. Previous studies have indicated a risk for introduction of highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) in PNL region. However, the impact and spreading pattern of AI virus in this region is unknown due to the lack of disease reports. It is noteworthy that other respiratory diseases, such Newcastle Disease (ND) and micoplasmosis due to *Mycoplasma gallisepticum* (MG), are also associated with migratory birds and can cause disturbances in domestic poultry. In this context, the aims of this work are to perform an epidemiological survey of respiratory diseases associated with migratory birds in backyard poultry and to propose a model of HPAIV spreading in PNL region. For this, it was evaluated (i) the presence of antibodies against AI, ND and MG in backyard poultry by ELISA, (ii) the presence of AI and ND virus in backyard poultry by real time RT-PCR, (iii) the potential risk factors associated with these pathogens, and (iv) the consequences of HPAIV introduction in PNL region using a mathematical model of virus spreading. In the sampled properties, frequency of antibodies against AI, ND and MG were 4.2%, 87.5% and 58.3%, respectively. All samples were negative for AI and ND in real time RT-PCR analysis. The first evaluation of risk factors associated to ND or MG in backyard poultry from Brazil was performed in this work. For ND, the risk was increased in the properties in which farmers used their own replacement poultry to restock their flock (PR=1.64; 95% CI: 1.11–2.42).

Furthermore, the increasing distance of the household flock to the “Laguna do Peixe” estuary is associated with decreasing NDV seropositivity (PR=0.94; 95% CI: 0.90 – 0.99). For MG, seropositivity was significantly associated with bird confinement (PR = 3.40, 95% CI: 1.93 – 5.99) and with interaction between “poultry/egg exchange and neighbors have poultry” (PR = 2.16, 95% CI: 1.24 – 3.76). In the simulations from the mathematical model of HPAIV spreading in PNLP region, most of the properties of this region would become infected up to 30 days outbreak beginning. Moreover, the infection would affect about 80 to 90% of the properties from the region, reaching up to 30 km distance from the index case. The results showed the circulation of pathogens associated with migratory birds in PNLP region. Since these pathogens were detected in backyard poultry, these birds can be considered sentinels for these agents in this region. Additionally, the data obtained improve the knowledge on spreading and dynamics of these diseases in properties with backyard poultry, as well as on potential risk factors. The set of these results can be useful to development of adequate biosecurity procedures for backyard flocks and surveillance programs to avoid pathogen dissemination.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Panorama da avicultura no RS	14
2.2. Parque Nacional da Lagoa do Peixe: interface entre aves migratórias e de subsistência	20
2.3. Doenças associadas a aves migratórias	27
<i>2.3.1. Influenza aviária</i>	28
<i>2.3.2. Doença de Newcastle</i>	41
<i>2.3.3. Micoplasmose – <u>Mycoplasma gallisepticum</u></i>	49
2.4. Modelagem de espalhamento de doenças infecciosas	53
<i>2.4.1. Modelagem de Influenza Aviária</i>	55
3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES	60
4. OBJETIVOS	62
5. PARTE EXPERIMENTAL & RESULTADOS	63
5.1. Capítulo I – Inquérito epidemiológico	63
<i>5.1.1. Metodologia</i>	63
<i>5.1.2. Resultados</i>	73
<i>5.1.3. Discussão e conclusões</i>	86
5.2. Capítulo II – Modelagem de espalhamento de HPAIV	97
<i>5.2.1. Metodologia</i>	97
<i>5.2.2. Resultados</i>	103
<i>5.2.3. Discussão e conclusões</i>	112
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
REFERÊNCIAS	119

1. INTRODUÇÃO

O litoral do Rio Grande do Sul (RS) exerce um papel importante como um local de pouso e alimentação para aves migratórias. A região do Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP) é considerada uma das mais importantes na América do Sul para as espécies neárticas que a utilizam como área de invernada, onde realizam muda de plumagem e acumulam gordura para a migração de volta aos locais de reprodução (Nascimento, 2011). Estas espécies geralmente chegam ao norte do país no final de setembro e à costa do RS em novembro, sendo que a volta para o hemisfério norte se inicia em abril (Sick, 1983; Nascimento & Santos, 2010).

Muitas das espécies de aves silvestres que ocorrem no Brasil são compartilhadas com outros países, e somente 10% a 15% delas são endêmicas ao país, não sendo encontradas em nenhum outro lugar do mundo (Valente et al., 2011). De um total de 1.677 espécies de aves do Brasil, 152 espécies são visitantes (sem reprodução no país), sendo que 91 espécies vêm do norte e 61 são visitantes do sul, das quais 60% e 74% são aquáticas, respectivamente (Sick, 1997; Alves, 2007). De acordo com as definições de Sick (1983) e Hayes (1995), migrante neotropical/austral é aquele que se reproduz no extremo sul da América do Sul e regularmente migra para o norte durante a estação não reprodutiva (inverno austral). Enquanto que as migrantes neárticas se reproduzem na América do Norte e regularmente migram longas distâncias em direção ao hemisfério sul durante a estação não reprodutiva (inverno boreal). Entre estas espécies neárticas estão os falcões-peregrinos (*Falco peregrinus*), que passam por algumas das grandes cidades brasileiras; os maçaricos e batuíras (Ordem Charadriiformes), que são comuns nas praias do país; e alguns pequenos sabiás (Família Turdidae), que utilizam o interior das florestas (Valente et al., 2011).

As aves migratórias podem estar envolvidas na dispersão geográfica de microorganismos como seus portadores biológicos ou como transportadores mecânicos. Muitas espécies de patógenos que infectam vertebrados, incluindo seres humanos, têm sido associadas com a migração de aves de vida livre (Hubálek, 2004). Dentre esses patógenos, destacam-se três que causam doenças respiratórias em aves (influenza aviária, Doença de Newcastle e micoplasmose) e que as aves migratórias são seus hospedeiros naturais ou ocasionais, sendo capazes de infectar aves domésticas pelo contato direto ou indireto (Alexander, 2000; Lierz et al., 2008; Feare, 2010; Henning et al., 2011; Shim et al., 2011; Hoque et al., 2012). Além disso, estas doenças se destacam por fazerem parte do Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA).

Atualmente, aves domésticas criadas em granjas comerciais no Brasil são mantidas com um bom nível de biossegurança, principalmente as destinadas à exportação. Porém, não há muitas informações sobre a circulação de patógenos aviários em aves domésticas de subsistência. Essas aves podem servir de sentinela de infecções para aves comerciais, pois geralmente são criadas na ausência de biossegurança e de gestão de saúde animal, podendo ter contato com patógenos carregados pelas aves silvestres e migratórias (Clark & Hall, 2006; Scherer et al., 2011). Por esse contato, as aves de subsistência contaminadas ainda poderiam servir de potenciais reservatórios e disseminar as infecções para outras aves migrantes (Hernandez-Divers et al., 2008).

Para a infecção de influenza aviária, aves domésticas de subsistência são consideradas como uma via importante para a disseminação e manutenção do vírus (Tiensin et al., 2005; Fielding et al., 2007; Hamilton-West et al., 2011), e muitos surtos não teriam acontecido se não fosse o envolvimento dessas aves (Walker et al., 2012). Isso acontece por vários fatores ambientais e de manejo dessa população, mas os principais fatores de risco relacionados

parecem ser a comercialização/troca de aves vivas entre os criadores, e a presença de lagoas ou fonte de água em comum ao redor dos domicílios (Paul et al., 2011). A contribuição das aves de subsistência na transmissão de influenza aviária pode ser suficiente para comprometer os esforços investidos no controle de infecções; e estratégias que não levam em conta a existência e a participação de aves de fundo de quintal são, provavelmente, superestimadas (Smith & Dunipace, 2011). Assim, inquéritos de enfermidades em aves de subsistência pode ser uma ferramenta importante em programas de monitoria e vigilância para verificar a circulação de patógenos associados a aves migratórias.

2. REVISÃO DA LITARATURA

2.1. Panorama da avicultura no RS

(Informações extraídas de Marks et al., Hora Veterinária, 198, 2014)

A avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. O País é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango e o líder em exportação, apesar de 69% da produção ser destinada ao mercado interno (UBABEF, 2013). Atualmente, a carne de frango nacional chega a 161 países. A produção e a exportação de outras aves, como peru e avestruz, também tem aumentado no Brasil e contribuído para diversificar a pauta de exportação do agronegócio brasileiro (MAPA, 2013). O crescimento quantitativo da cadeia produtiva reflete um crescimento no consumo de carne de frango, que passou dos 29,9 kg de consumo per capita em 2000 para 45 kg em 2012, representando um aumento de 50% nos últimos 12 anos (UBABEF, 2013). No ano de 2013, a receita efetiva da exportação de carne de frango e peru ficou próxima dos US\$ 8 bilhões, correspondendo praticamente à metade da receita cambial global proporcionada pelas carnes (ASGAV, 2014). Em relação à produção de ovos, o país ocupa o sétimo lugar no ranking mundial, o que representam 3,34% da produção total do mundo.

Dentre os estados brasileiros, o RS tem grande importância na produção e exportação avícola. Em 2012 foi responsável por 14,2% do abate de frango no Brasil e 18,5% das exportações (UBABEF, 2013). Além disso, é o quarto maior estado produtor e segundo exportador de ovos no País (IBGE, 2013).

Em 486 (97,78% do total) municípios no estado houve produtores que declararam possuir aves em 2013. Das espécies declaradas, a galinha doméstica concentra a maior

proporção (88%) das declarações dos produtores (**Tabela 1**), sendo sua cadeia de produção dividida em corte, postura e subsistência (aves para o consumo próprio).

Tabela 1- Espécies de aves declaradas pelos produtores gaúchos na declaração anual de rebanho de 2013.

Espécies declaradas	Nº de produtores	% de produtores
Galinha doméstica	164.810	88,0
Peru	3.095	1,7
Codorna	1.268	0,7
Galinha d'Angola	4.116	2,2
Ratitas	102	0,1
Palmípedes	12.318	6,6
Outras aves	1.559	0,8
Total	187.268	100

Na finalidade corte, 94,9% (7.830) das propriedades existentes são criações de frango de corte para abate (comercial) e somente 5,1% (417) são granjas registradas destinadas a reprodução de aves de corte. Granjas para reprodução de corte incluem avozeiros, matrizeiros, incubatórios e para recria de matrizes. No RS há oito avozeiros, sendo cinco granjas de produção e três incubatórios (produtor de aves de um dia para produção de matrizes). Quanto às matrizes, são 409 granjas que incluem 317 para produção, 58 para recria das matrizes (de um dia até a idade de produção) e 34 incubatórios (produtor de aves de um dia de frango de corte) (**Tabela 2**).

Tabela 2- Descrição do tipo de exploração das granjas de corte para reprodução registradas.

Tipo de exploração	Nº de produtores	% de produtores
<i>Avozeiros</i>	8	1,9
Produção	5	1,2
Incubatório	3	0,7
<i>Matrizeiros</i>	409	98,1
Produção	317	76,0
Incubatório	34	8,2
Recria	58	13,9
<i>Total Geral</i>	<i>417</i>	<i>100</i>

Para postura, 93,4% (2.050) dos produtores declararam em 2013 que criam poedeiras na fase de recria (de um dia até em torno de 22 semanas de vida) ou de produção (fase de produção de ovos para consumo). Já para o tipo de exploração reprodução (matrizeiro ou incubatório) na finalidade postura, foram computadas 144 (6,6%) declarações.

O número de galinhas domésticas declaradas no ano de 2013 foi de 335.866.944 distribuídas em 164.810 propriedades. Nestas declarações, 87,8% (144.751 propriedades), são granjas com criação de aves de subsistência (**Tabela 3**). Levando em consideração a quantidade de aves declaradas pelo produtor pode-se notar que no RS as granjas de subsistência, que representam 87,8% do total, contêm somente 29% do total de animais declarados. Isto parece confirmar que as granjas de subsistência no estado são geralmente pequenas criações de aves com o objetivo de uso destes animais apenas para consumo próprio. Sabe-se que essas granjas de subsistência possuem pouca ou nenhuma medida de biossegurança, portanto se faz necessário que as granjas comerciais adotem medidas que visem evitar seu contato com essas aves de subsistência, possíveis veiculadoras de patógenos.

Tabela 3- Criações com aves de subsistência declaradas na declaração anual de 2013.

Finalidade	Nº de animais	% de animais	Nº de produtores	% de produtores
Subsistência	97.366.324	29,0	144.751	87,8
Total declarado	335.866.944	100	164.810	100

Além das galinhas, o RS se destaca pela produção de outras espécies de aves. Dentre estas outras espécies (não contabilizando galinha doméstica), a maior produção é de palmípedes - como pato, marreco e ganso (54,8% das propriedades). Porém, também há uma quantidade considerável de produtores que declararam em 2013 possuir galinha d'Angola (18%) e peru (13,8%). Além disso, há estabelecimentos com codornas (5,6%) e com ratitas

(avestruz e ema) (0,5%) no RS. Na categoria “outras aves” foram agrupadas aves como pombo, pavão, faisão, aves ornamentais ou silvestres (pássaros, papagaio, caturrita, etc).

Quando se analisa a localização da produção de galinhas no estado, nota-se que a região Noroeste Rio-Grandense concentra 48,3% do total de produtores. Na região Centro Oriental Rio-Grandense estão 16% dos produtores que possuem galinha doméstica, seguido da região Nordeste Rio-Grandense (10%), região Metropolitana de Porto Alegre (9%), Sudeste Rio-Grandense (8,2%) e região Centro Ocidental Rio-Grandense (6,6%). A região Sudoeste Rio-Grandense foi a menos representativa na criação de galinhas com 1,8% dos produtores (**Tabela 4**).

Tabela 4- Distribuição das propriedades com galinha doméstica por mesorregião do RS.

ID	Mesorregião	% de produtores					Total
		Corte comercial	Corte reprodução	Postura comercial	Postura reprodução	Subsistência	
1	Noroeste Rio-Grandense	32,0	27,6	6,9	20,8	49,8	48,3
2	Nordeste Rio-Grandense	30,3	29,5	2,8	43,1	8,9	10,0
3	Centro Oriental Rio-Grandense	22,6	24,0	18,9	13,9	15,6	16,0
4	Metropolitana de Porto Alegre	13,1	17,5	23,7	12,5	8,6	9,0
5	Sudeste Rio-Grandense	1,5	1,4	34,8	2,8	8,2	8,2
6	Centro Ocidental Rio-Grandense	0,3	0,0	3,7	2,8	7,0	6,6
7	Sudoeste Rio-Grandense	0,2	0,0	9,2	4,2	1,8	1,8

As frequências de observações de finalidade/exploração quando analisadas separadamente em cada mesorregião mostram diferenças na concentração de propriedades, como demonstrado na **Tabela 4** e **Figura 1** (quadros A ao E). Na região Noroeste houve a maior frequência de propriedades de corte comercial (32%) e de aves para subsistência (49,8%). A criação de galinhas para subsistência também está localizada nas regiões Centro-Oriental (15,6%) e Metropolitana (8,6%). A região Nordeste se destaca pela produção de aves

para reprodução na finalidade corte (29,5%) e na finalidade postura (43,1%). O Sudeste concentrou a maior parte dos produtores de postura comercial (34,8%).

Em relação à localização das criações de outras espécies declaradas, quase metade (48,5%) se concentra na região Noroeste (**Figura 1F**). Esta região se destaca pela maior proporção de todas as espécies declaradas (peru, codorna, galinha d'Angola, palmípedes, ratitas e outras aves).

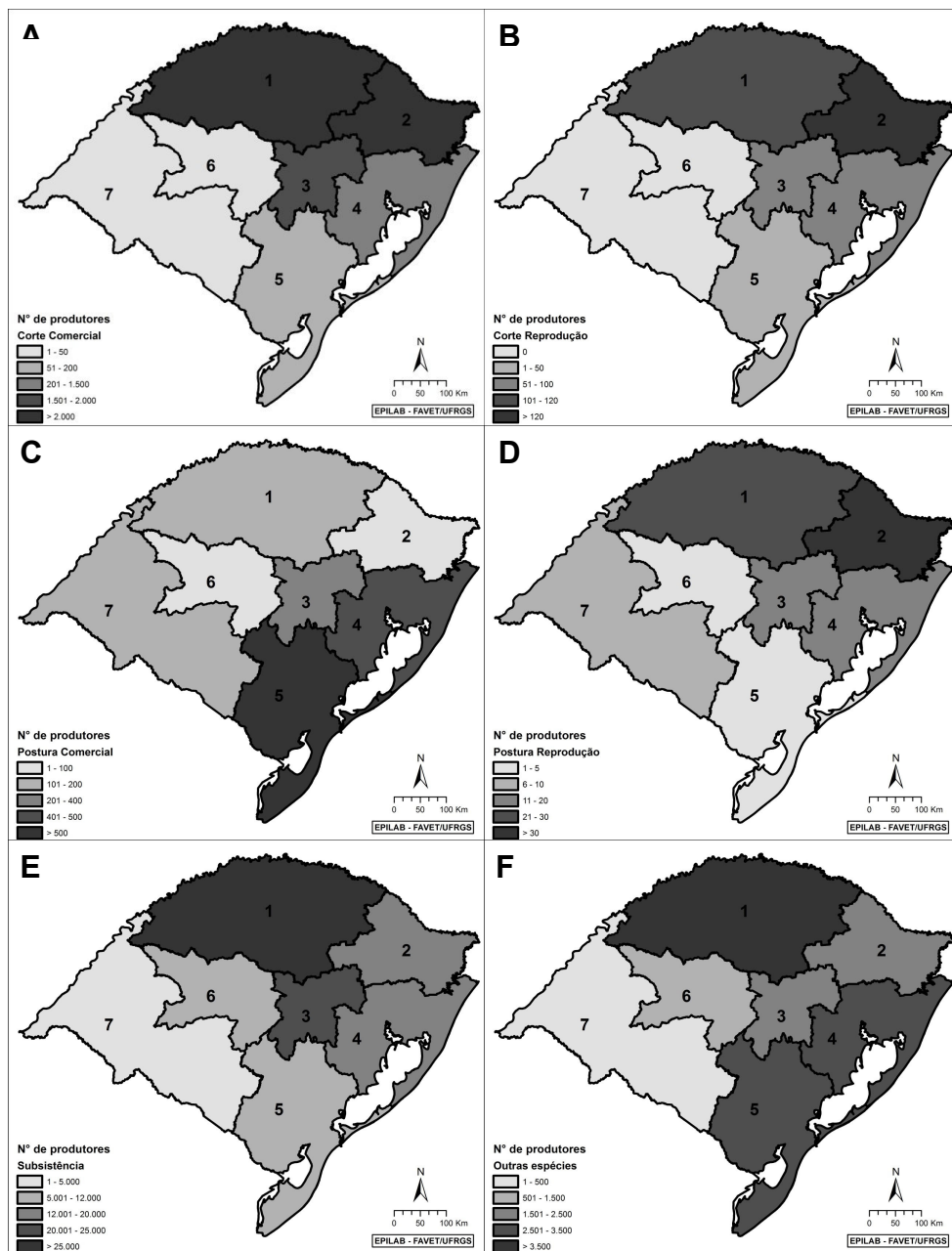


Figura 1- Mapas com as frequências de propriedades por tipo de finalidade e exploração em cada mesorregião do RS. Identificação das mesorregiões conforme numeração da Tabela 4.

A produção de frango de corte (comercial) está localizada principalmente nas regiões Noroeste (32% das propriedades), Nordeste (30,3%) e Centro Oriental (22,6%). Na **Figura 2** pode-se visualizar a distribuição dos produtores de corte comercial e a localização dos frigoríficos de frango de corte no estado. No total são 63 frigoríficos registrados no RS com inspeção federal, estadual ou municipal. Destes, 57 são abatedouros de galinhas. Estes frigoríficos estão distribuídos em 43 municípios do estado, sendo a maior quantidade (18) encontrada na região Noroeste.

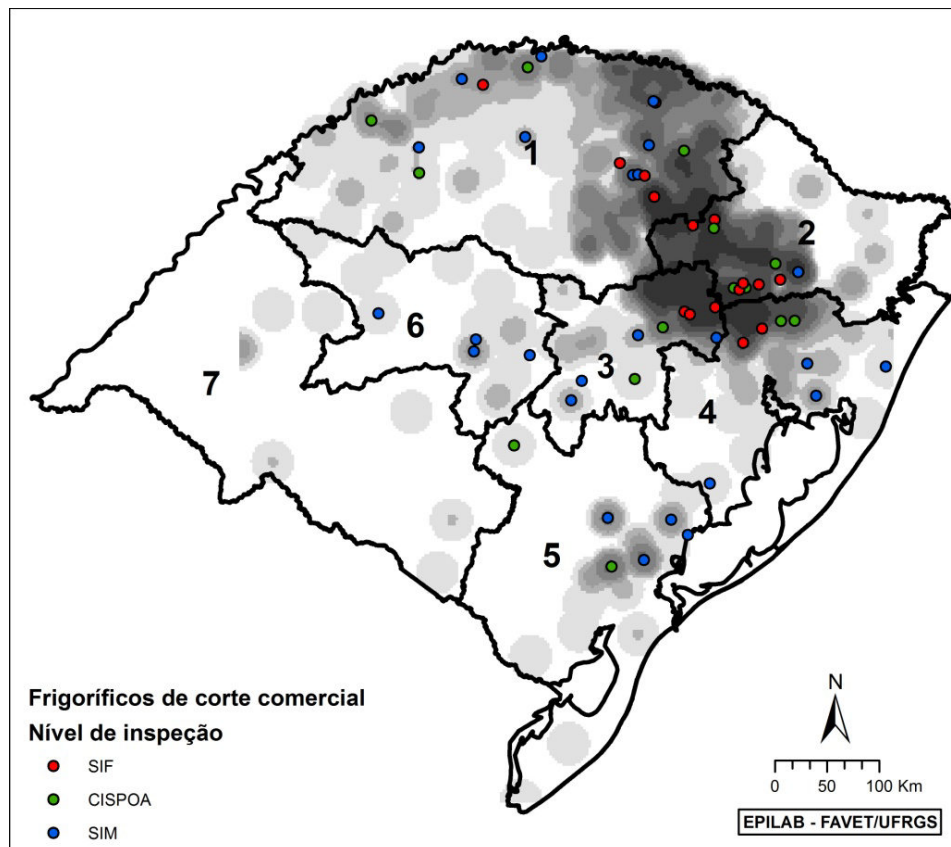


Figura 2- Distribuição geográfica dos frigoríficos de frangos de corte registrados. A escala em cinza demonstra o efetivo de propriedades de aves de corte comerciais no RS, na qual as áreas mais escuras apresentam maior concentração de propriedades, enquanto as áreas mais claras têm menor concentração. Identificação das mesorregiões conforme numeração da Tabela 4. SIF: Serviço de inspeção federal, CISPOA: Coordenadoria de Inspeção de Produtos de Origem Animal do RS, SIM: Serviço de inspeção municipal

A avicultura no RS se caracteriza por ser diversificada, tendo a maioria das propriedades voltada para a criação de aves de subsistência. Na parte comercial, percebe-se uma maior quantidade de estabelecimentos de produção de frango para abate ou de ovos comparado com os estabelecimentos de reprodução. Apesar disso, o RS concentra uma quantidade considerável de avozeiros e matrizeiros registrados, destacando o estado na produção de ovos férteis no Brasil. Além da tradicional importância da avicultura na produção animal gaúcha, há uma grande diversidade de criações e variabilidade nas mesorregiões do RS.

2.2. Parque Nacional da Lagoa do Peixe: interface entre aves migratórias e de subsistência

O Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP) está localizado no litoral sul do RS entre a Laguna dos Patos e o Oceano Atlântico, abrangendo os municípios de Tavares e Mostardas (**Figura 3**). O parque foi criado em 1986 com a finalidade de proteger um dos sítios mais importantes da América do Sul para aves migratórias (Knak, 1999). Trata-se de uma área de 34.400 ha composta de ambientes lagunares, matas, banhados, marismas, campos úmidos, praias e a Laguna do Peixe (LP). As características naturais peculiares e a disponibilidade de alimentos fazem da LP um importante sítio de invernada para aves migratórias vindas, principalmente, do hemisfério norte, que utilizam o local para pouso e alimentação após o período de reprodução no verão boreal (Resende e Leeuwenberg, 1987; Nascimento, 1995; Nascimento, 2011).

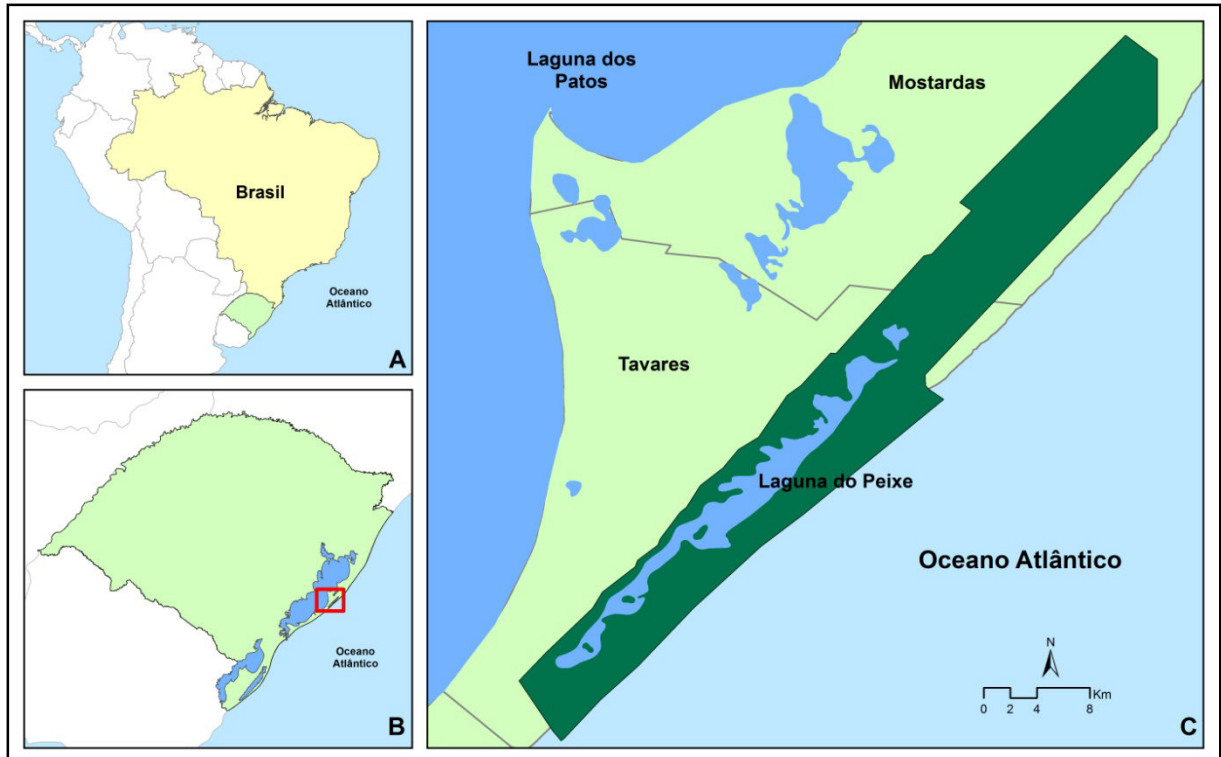


Figura 3- Localização do PNLP. Painel A: localização do RS (em verde). Painel B: localização da região do PNLP no RS (quadrado vermelho). Painel C: limites do PNLP (região em verde escuro).

Em 1990, o PNLP foi nomeado pela Rede Hemisférica de Reservas para Aves Limícolas (RHRAP) como sítio de importância internacional (WHSRN, 2014). Em 1992 foi reconhecido como zona núcleo da reserva da biosfera em conjunto com o projeto mata atlântica (RBMA, 2014). A área também está presente na Lista de Zonas Úmidas de Importância Internacional da convenção Ramsar desde 1993 (Ramsar, 2014). Além disso, se caracteriza como sendo uma Área Importante para a Conservação das Aves (*Important Bird Area – IBA*) (Save, 2014).

A situação fundiária do parque não está nem em parte regularizada, por isso algumas ameaças estão presentes, como trânsito de veículos na praia e através da LP, a pesca predatória na faixa de oceano abrangida pelo parque, a caça clandestina, a drenagem de áreas

úmidas para o cultivo de arroz, e a presença de áreas florestadas por pinus (espécie exótica) em grande parte da extensão do parque (Knak, 1999; Bencke et al., 2006). O gado também está presente em muitos setores, e poucas são as áreas que possuem os seus limites delimitados por cercas que possam impedir o acesso livre de bovinos. Em vários pontos da LP a cobertura vegetal já foi seriamente comprometida pela constante remoção de biomassa e pisoteio animal. Porém, apesar disso, ainda não se sabe até que ponto a presença do gado não poderia aumentar as áreas de hábitat favorável a *Tryngites subruficollis* (maçarico-acanelado, espécie altamente ameaçada a extinção) (Bencke et al., 2006).

A ligação da LP com o mar é intermitente e se dá pela abertura da barra, que antigamente ocorria somente de forma natural, mas hoje é feita artificialmente, durante o inverno, para garantir a alta produtividade das águas para os pescadores e uma maior área para pastagem dos bovinos. Esta comunicação (estuário) se mantém normalmente até o verão (início de janeiro). Observações indicam que após a abertura deste estuário há uma substituição imediata de áreas inundadas por áreas com água rasa ou lodaçais, favorecendo a formação de áreas para o forrageio de aves limícolas. Este fato torna a região do estuário um ambiente propício para pouso e alimentação de aves na rota de migração e para outras aves residentes, sendo o local com maior concentração e riqueza de espécies da região (Resende e Leeuwenberg, 1987; Knak, 1999; Gonçalves, 2009).

Cerca de 270 espécies já foram catalogadas no PNLP (**Tabela 5**), incluindo 12 em algum grau de ameaça (**Tabela 6**). Os principais migrantes são as aves da ordem Charadriiformes pertencentes às famílias Scolopacidae e Charadriidae, conhecidos como maçaricos e batuíras. Também há, em menor número de espécies, migrantes regulares do hemisfério sul que entre maio a agosto (outono/inverno austral) deslocam-se para latitudes temperadas em busca de condições menos severas.

Tabela 5- Aves catalogadas no PNLP.

Ocorrência	Nº de espécies	Espécies que nidificam
Residente anual	176	55
Migratória do sul do Hemisfério Sul	18	02
Migratória do Hemisfério Norte	28	-
Visitantes pelágicos do Hemisfério Norte	03	-
Visitantes pelágicos do Hemisfério Sul	19	-
Vagante	08	-
Migrante, visitante de verão	15	01
Residente de primavera/verão	02	-
Desconhecido	05	-

Fonte: ICMBio – Dados apresentados no 10º Festival Brasileiro das Aves Migratórias, 2013.

Tabela 6- Espécies de aves ameaçadas catalogadas no PNLP.

Espécie	Nome popular	Ameaça
<i>Calidris canutus rufa</i>	Maçarico-de-papo-vermelho	Altamente ameaçada
<i>Tryngites subruficollis</i>	Maçarico-acanelado	Altamente ameaçada
<i>Calidris alba</i>	Maçarico-branco	Preocupante
<i>Limosa haemastica</i>	Maçarico-de-bico-virado	Preocupante
<i>Numenius phaeopus</i>	Maçarico-galego	Preocupante
<i>Tringa solitaria</i>	Maçarico-solitário	Preocupante
<i>Limnodromus griseus</i>	Narceja-de-costas-brancas	Preocupante
<i>Phalaropus tricolor</i>	Pisa-n'água	Preocupante
<i>Porzana spiloptera</i>	Sanã-cinza	Em perigo (RS)
<i>Circus cinereus</i>	Gavião-cinza	Vulnerável (RS)
<i>Larus atlanticus</i>	Gaivota-de-rabo-preto	Vulnerável (RS)
<i>Sporophila collaris</i>	Coleiro-do-brejo	Vulnerável (RS)

Fonte: ICMBio – Dados apresentados no 10º Festival Brasileiro das Aves Migratórias, 2013.

Como exemplos das espécies migratórias do Hemisfério Norte, tem-se os maçaricos *Calidris canutus*, *Calidris fuscicollis*, *Calidris alba* e *Limosa haemastica*. Na LP, estas espécies realizam muda de plumagem e acumulam gordura para a migração de volta aos locais de reprodução (Nascimento, 1995). A espécie *Calidris canutus* (maçarico-de-papo-vermelho) tem a LP o seu principal ponto de parada no Brasil para alimentação e repouso na migração de retorno ao Ártico, vindo da Argentina. A *Calidris alba* (maçarico-branco) é uma das espécies que primeiro chegam à costa gaúcha e uma das últimas a retornar ao Hemisfério Norte. A *Limosa haemastica* (maçarico-de-bico-virado), espécie altamente vulnerável, encontra-se na LP em um longo período (primavera e verão) em altas concentrações (30% da população mundial desta espécie). Outras espécies como *Sterna hirundo* (trintaréis-boreal) tem na LP a maior concentração da costa gaúcha, e o *Tryngites subruficollis* (maçarico-acanelado) tem nos campos úmidos em volta da LP um de seus principais sítios de invernagem em escala mundial (Knak, 1999).

De acordo com Bencke e colaboradores (2007), a migração para o RS ocorre basicamente em cinco grandes sistemas migratórios, utilizando cerca de oito rotas principais, como representado na **Figura 4**. Como já mencionado o principal sistema é das aves vindas do Hemisfério Norte, ou sistema “Neártico-Neotropical”, onde as aves reproduzem-se no norte e deslocam-se para a América do Sul durante o inverno boreal. As espécies podem vir da região ártica (norte do Canadá e Alasca) ou da porção continental dos Estados Unidos da América (EUA) e sul do Canadá e podem utilizar até três diferentes rotas migratórias.

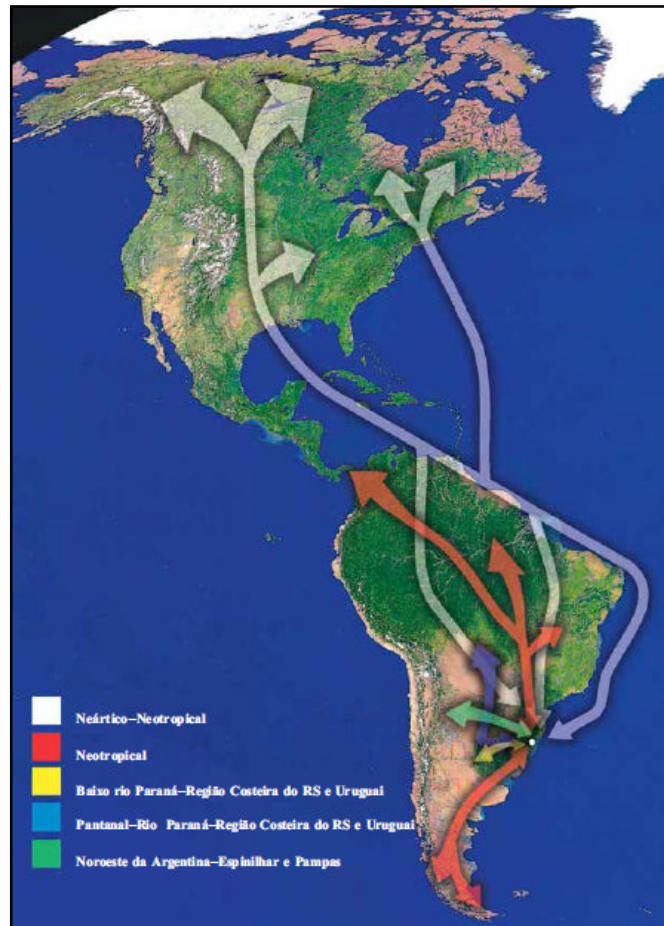


Figura 4- Principais sistemas e rotas migratórias de aves até o RS. Fonte: Bencke et al., 2007.

No sistema “Neotropical” as espécies migram da América do Sul e Central e se movem para o norte durante o inverno austral. Além disso, neste sistema, migrantes podem vir de locais mais meridionais do continente (Patagônia, sul do Chile e Terra do Fogo) e o RS servir como área de reprodução para aves que se deslocam para o norte no inverno. Estas aves que migram do Hemisfério sul para o norte são conhecidas de migrantes austrais (Sick, 1983; Hayes, 1995).

No sistema “baixo rio Paraná-região costeira do RS e Uruguai” (leste-oeste) a migração é sazonal e irregular e depende das condições hídricas de cada uma das regiões.

Utilizam esta rota principalmente aves aquáticas, como marrecão (*Netta peposaca*) e marrecaneleira (*Dendrocygna bicolor*).

O sistema “Pantanal-rio Paraná-região costeira do RS e Uruguai” é representado por aves aquáticas que se reproduzem no Pantanal e se deslocam no sentido sul-sudeste durante o período de cheia (primavera/verão). O último sistema (Noroeste da Argentina-Pampa) inclui a migração de espécies aquáticas e passeriformes entre a Argentina e o RS.

Além das espécies que chegam à LP de vários locais do continente americano, deslocamentos esporádicos e não sazonais de aves originárias da África, Espanha Meridional e Europa são observadas na costa. Estes deslocamentos são característicos de indivíduos jovens em processo de aprendizagem, espécies marinhas e costeiras e espécies colonizadoras (Azevedo Jr, 2007).

A região no entorno do PNLP, além da presença das várias espécies de aves silvestres migratórias e residentes já mencionadas, é caracterizada pela presença de uma tradicional criação de aves de subsistência, tornando a região um potencial local de risco para a introdução e espalhamento de doenças infecciosas associadas a aves migratórias. Devido a isto, por se caracterizar como uma área onde há uma grande concentração de aves migratórias, principalmente Anseriformes e Charadriiformes, nas proximidades de áreas úmidas, juntamente com uma concentração de população humana e criação de aves de subsistência, a região do PNLP se tornou um dos sítios para monitoramento permanente de influenza aviária e Doença de Newcastle no Brasil desde a implementação do Plano de Prevenção a Influenza Aviária e de controle e prevenção da Doença de Newcastle em 2006. Atualmente, existem 447 propriedades que criam aves de subsistência, incluindo anatídeos, cadastradas nos 10 km do entorno da LP.

2.3. Doenças associadas a aves migratórias

Aves migratórias podem ser responsáveis por carrear diversos microorganismos capazes de infectar outras aves (domésticas ou silvestres) e mamíferos, inclusive o ser humano, distribuindo os patógenos ao redor do mundo (Hubálek, 2004). O estresse associado com o processo de migração pode aumentar a suscetibilidade destas aves aos microorganismos, facilitando a infecção e o posterior espalhamento do patógeno (Dhama et al., 2008).

As aves migratórias podem estar envolvidas na dispersão de microorganismos como seus portadores biológicos, transportadores mecânicos, ou como portadores de ectoparasitas hematófagos infectados (Hubálek, 2004). Muitas espécies de microorganismos patogênicos têm sido associadas com aves migratórias de vida livre (Hubálek, 2004; Dhama et al., 2008). Na **Tabela 7** estão listados os principais patógenos que podem ser encontrados infectando aves nas Américas e no mundo.

Neste trabalho, três patógenos associados a aves migratórias e que causam doença respiratória em aves domésticas serão abordados por sua importância nos programas de vigilância no país. Estas doenças são a influenza aviária, a doença de Newcastle e a micoplasmose causada por *Mycoplasma gallisepticum*.

Tabela 7- Principais patógenos associados com aves migratórias.

Agente	Sistema afetado	Associação com aves migratórias	Distribuição
Vírus da influenza aviária	Respiratório	Principal hospedeiro	Mundial
Vírus da Doença de Newcastle	Respiratório	Principal hospedeiro	Mundial
<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	Respiratório	Hospedeiro ocasional	Américas
Vírus da encefalomielite equina	Neurológico	Principal hospedeiro	Américas
Vírus da encefalite de Saint Louis	Neurológico	Principal hospedeiro	Américas
Vírus do Oeste do Nilo	Neurológico	Principal hospedeiro	Mundial
<i>Campylobacter jejuni</i>	Digestivo	Principal hospedeiro	Mundial
<i>Salmonella entérica</i>	Digestivo	Hospedeiro ocasional	Mundial
Poxvírus aviário	Cutâneo	Principal hospedeiro	Mundial
Adenovírus aviário	Reprodutivo	Principal hospedeiro	Mundial
<i>Chlamydomphila psittaci</i>	Sistêmico	Principal hospedeiro	Mundial
<i>Escherichia coli</i>	Sistêmico	Hospedeiro ocasional	Mundial
<i>Pasteurella multocida</i>	Sistêmico	Principal hospedeiro	Mundial

Fonte: Hubálek, 2004.

2.3.1. Influenza aviária

A influenza aviária, ou, como denominada originalmente, "peste aviária", foi inicialmente reconhecida como uma doença infecciosa de aves em 1878. Apesar de em 1901 pesquisadores terem classificado o responsável por causar a doença como sendo um agente filtrável (possivelmente um vírus), foi só em 1955 que o pesquisador Werner Schäfer caracterizou este agente como um vírus influenza A (Alexander, 2000).

Até 1958 uma série de epizootias do vírus da influenza aviária (AIV) ocorreu em várias partes do mundo. A partir de 1959, o surgimento de um AIV de alta patogenicidade (HPAIV) originou diversos outros surtos no mundo envolvendo um grande número de espécies de aves (Alexander & Brown, 2009), demonstrando a alta infecciosidade e disseminação do vírus.

A) Etiologia

A influenza aviária é causada pelo Influenzavirus A pertencente da família *Orthomyxoviridae*. Esta família é composta por vírus envelopados, com genoma segmentado de RNA de fita simples, e está dividida em mais cinco gêneros, além do Influenza A, que são Influenzavirus B, Influenzavirus C, Thogotovirus, Isavirus e Quaranjavirus (ICTV Master Species List, 2012).

Os vírus influenza A são os que infectam a maior variedade de hospedeiros, incluindo aves, mamíferos e seres humanos. O genoma deste gênero é composto por oito segmentos de RNA que codificam dez proteínas virais (Webster et al., 1992; Swayne & Halvorson, 2003; de Jong & Hien, 2006; Palese & Shaw, 2007), como demonstrado na **Tabela 8**.

Tabela 8- Proteínas virais codificadas pelo genoma do vírus influenza A.

Segmento	Gene	Proteína	Função
1	PB2	Polimerase básica 2	Replicação– polimerase
2	PB1	Polimerase básica 1	Transcrição – endonuclease
3	PA	Polimerase ácida	Transcrição e replicação - protease
4	HA	Hemaglutinina	Ligação aos receptores e atividade de fusão
5	NP	Nucleoproteína	Síntese e encapsidação do RNA viral
6	NA	Neuraminidase	Liberação dos novos vírus
7	M	Proteína da matriz (M1)	Proteção e exportação do nucleocapsídeo
		Proteína integral do envelope (M2)	Canal de protons
8	NS	Proteína não estrutural NS1	Replicação - interfere no mRNA celular
		Proteína não estrutural NS2	Exportação nuclear dos RNPs virais

A diferenciação entre os gêneros é devida as diferenças antigênicas da nucleoproteína (NP) e da proteína da matriz (M1) (Webster et al., 1992), mas sua classificação em subtipos é baseada nas características estruturais e reatividade sorológica das moléculas de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Até recentemente, eram conhecidos 16 subtipos

de HA (H1 – H16) e nove de NA (N1 – N9) do vírus da influenza A, porém recentemente duas novas linhagens distintas de influenza A em morcegos foram caracterizadas (H17N10 e H18N11) (Tong et al., 2012; Tong et al., 2013).

O grau de patogenicidade do vírus pode variar dependendo das características estruturais da HA (na região de clivagem pelas células do hospedeiro) em alta e baixa patogenicidade. O H5 e o H7 estão geralmente relacionados com influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI) (Alexander, 2007), mas há evidências de que estes subtipos tenham emergido de progenitores de AIV de baixa patogenicidade (LPAIV) de aves domésticas (Capua & Marangon, 2000).

A HA media a adsorção viral via interação com o ácido siálico (SA), que são moléculas encontrados na extremidade de cadeias polissacarídicas na superfície da célula do hospedeiro (Palese & Shaw, 2007; Matrosovich et al.; 2009). Enquanto alguns tipos de vírus da influenza apresentam especificidade por SA ligados à galactose via ligações do tipo $\alpha 2,3$, outros apresentam especificidade por SA $\alpha 2,6$ (Ito et al., 1997; Meng et al., 2010). Os tratos digestivo e respiratório das aves apresentam principalmente SA $\alpha 2,3$ (Wright et al., 2007). Já os suínos apresentam uma distribuição relativamente uniforme de SA $\alpha 2,3$ e de SA $\alpha 2,6$ (Ha et al., 2002). Classicamente, considera-se que os tecidos respiratórios dos humanos possuem apenas SA $\alpha 2,6$. Contudo, foi demonstrado que também existem resíduos de SA $\alpha 2,3$ no sistema respiratório humano (Shinya et al., 2006). Sugere-se que, como o SA $\alpha 2,3$ é encontrado apenas em pequenas quantidades e somente no trato respiratório inferior dos humanos, isto restringiria as infecções de pessoas por vírus de origem aviária a situações de contato frequente e intenso com as aves (Shinya et al., 2006; Matrosovich et al.; 2001). Porém, isso não torna a infecção direta ave-homem impossível. Em Bangladesh, uma pesquisa realizada em domicílios que criam aves de subsistência mostrou que os criadores não fazem

distinção entre as doenças; percebem a transmissão de doenças de ave para ave, mas não de aves para humanos; geralmente mantem as aves doentes debaixo da cama; e se a ave não se recupera é abatida para consumo ou venda (Sultana et al., 2012). Ou seja, os criadores de aves de subsistência acabam tendo um contato próximo com aves doentes durante o manejo e abate.

Além dos diferentes tipos e subtipos de influenza, uma determinada amostra de vírus pode sofrer diversas mudanças ao longo da evolução. Nos vírus influenza A, as mudanças mais importantes ocorrem nas proteínas HA e NA (Wright et al., 2007). Em geral, estas alterações nos vírus da influenza são divididas em dois tipos principais: *drift* e *shift* antigênico (revisão em Marks & Canal, 2010).

O *drift* antigênico é uma modificação comum onde mutações pontuais nos genes da HA e NA ocorrem aleatoriamente e podem alterar epítomos de reconhecimento viral por anticorpos gerados contra o vírus original (Forleo-Neto et al., 2003; Wright et al., 2007). O *shift* antigênico é uma alteração que, em sua maior parte, dependente de outro fenômeno conhecido como rearranjo genético (*genetic reassortment*), que é facilitado pelo fato do vírus influenza possuir genoma segmentado. Este ocorre quando duas amostras diferentes de vírus trocam material genético dentro de uma mesma célula de um hospedeiro infectado com duas cepas de influenza simultaneamente, originando uma nova cepa viral (Capua & Alexander, 2004; Lipatov et al., 2004; Wan et al., 2007; Wright et al., 2007). Estas mutações e rearranjos no material genético do vírus podem ser os responsáveis pelas alterações na patogenicidade (de LPAIV para HPAIV) e na capacidade infecciosa do vírus para uma possível melhora da adaptação a um novo hospedeiro (Banks et al., 2001; Swayne & Halvorson, 2003; Alexander, 2007).

B) Aspectos epidemiológicos e apresentação da doença

A maioria dos subtipos de HA e NA já foram identificados em aves silvestres ou domésticas nas diferentes combinações possíveis e em diferentes graus de patogenicidade (Alexander, 2007). Os principais subtipos de surtos de HPAIV isolados nos últimos anos foram o H5N1, H5N2, H7N1, H7N3 e H7N7 (Capua & Alexander, 2004; Wright et al., 2007). O H9N2 é o principal subtipo de LPAIV isolado e possui um grande potencial pandêmico, já que possui afinidade pelos dois tipos de receptores virais, o SA α 2,3 e α 2,6 (Matrosovich et al., 2001; Wright et al., 2007).

O recente surto de gripe H7N9 na China resultou em muitos casos humanos com uma alta taxa de mortalidade (Li et al., 2014). Aves foram consideradas a provável fonte de infecção para os seres humanos com base na análise da sequência genética e isolamentos do vírus de mercados de aves vivas (Chen et al., 2013). Dados experimentais mostraram que galinhas são susceptíveis a infecção e excretam grandes quantidades de vírus e foram, provavelmente, importantes na propagação do vírus em humanos (Pantin-Jackwood et al., *in press*). Além disso, pombos, que foram originalmente sugeridos como uma possível fonte do H7N9 por causa do isolamento do vírus de vários pombos em mercados de aves na China, são geralmente resistentes à infecção e não são considerados suficientemente susceptíveis para desempenhar um papel na disseminação do vírus (Pantin-Jackwood et al., *in press*).

O reservatório natural dos vírus influenza A são as aves aquáticas, principalmente das ordens Anseriformes (patos, gansos) e Charadriiformes (gaiotas, andorinhas, maçaricos), onde os vírus (principalmente os de baixa patogenicidade) parecem ter alcançado um alto nível de adaptação e por isso não chegam a causar lesões e sinais clínicos nas aves (Webster et al., 1992; Clark & Hall, 2006; Stallknecht & Brown, 2009). Aldous e colaboradores (2010) demonstraram que há diferença na suscetibilidade das diferentes espécies de aves quando

inoculados com HPAIV (H5N1 e H7N1). Os perus são 100 vezes mais suscetíveis do que as galinhas e ambas as espécies são mais suscetíveis ao H5N1 do que a outros subtipos, o que também acontece com patos. Nenhum pato morreu quando infectado com H7N1 e foram capazes de sobreviver e excretar o vírus H5N1 pelo dobro de tempo que as galinhas e perus (Aldous et al., 2010).

A maioria das aves aquáticas se apresenta assintomática ao AIV, mas algumas podem ser sensíveis e demonstrar doença clínica quando infectados por alguns subtipos de H5N1 (Wright et al., 2007). Porém, atualmente, o H5N1 de origem asiática também tem se tornado não patogênico para patos. Essa espécie de ave desempenharia um papel importante na manutenção e disseminação do vírus (Krauss et al., 2004; Hulse-Post et al., 2005; Kim et al., 2009), principalmente quando entram em contato com animais suscetíveis, como aves domésticas (inclusive comerciais) e outros animais. Ward e colaboradores (2009) mostraram que infecções por HPAIV subtipo H5N1 em aves de subsistência durante um surto no outono de 2005 na Romênia podem ter ocorrido através da exposição destas aves a populações de aves aquáticas migratórias assintomáticas.

Os períodos de latência e infeccioso do AIV também vão depender do subtipo viral e da espécie de ave infectada. A presença do vírus em galiformes é frequentemente detectada a partir do primeiro dia em infecções experimentais, principalmente com H5N1 (Bouma et al., 2009; Spekreijje et al., 2011), tornando o período de latência muito curto. Este período pode se alongar até quatro dias quando as galinhas são inoculadas com outros subtipos de HPAIV (Bos et al., 2007; Aldous et al., 2010).

O período infeccioso do subtipo H5N1 é de horas a dois dias em galinhas (van der Goot et al., 2003a; Bouma et al., 2009; Spekreijje et al., 2011), e de sete até 17 dias em patos (Hulse-Post et al., 2005). Este período também pode variar dependendo da patogenicidade do

vírus. Van der Goot e colaboradores (2003a e 2003b) compararam as características de transmissão de amostras de mesmo subtipo, mas de patogenicidade diferentes. Estes autores notaram que vírus da HPAI, além de serem mais contagiosos, induzem um período infeccioso mais longo do que os de baixa patogenicidade. Outro estudo mostrou que quando galinhas são inoculadas com um subtipo de LPAIV (H7N2), após dois dias já é possível a detecção do vírus e o período de disseminação ocorre geralmente dentro de uma ou duas semanas após a inoculação dependendo da idade da ave (Lu & Castro, 2004). Quando se trata da infecção de rebanho, o período infeccioso pode variar de sete a 14 dias (Stegeman et al., 2004; Mannelli et al., 2007; Ward et al., 2008).

A partir de estimativas de modelos epidemiológicos em infecções experimentais de LPAIV H5 e H7 em perus, a média do período de latência foi de 2,9 dias e do período infeccioso foi de 8,2 dias quando considerado a presença do RNA viral nas fezes. Quando a definição baseou-se no isolamento de vírus vivo (capaz de se replicar) a partir das fezes, a média da latência foi de 8,7 dias e do período infeccioso foi de 2,3 dias (Comin et al., 2011).

A transmissão entre as diferentes espécies de aves e para mamíferos ocorre diretamente por via aerógena ou indiretamente através das fezes, água, aerossóis e outros materiais contaminados, já que a excreção do vírus é realizada através das fezes e secreções respiratórias (Swayne & Halvorson, 2003; Stallknecht & Brown, 2009).

A transmissão indireta necessita de doses mais elevadas do vírus para causar infecção, quando comparado com a exposição direta, principalmente se for por via nasal (Kwon & Swayne, 2010). O AIV em sedimentos de lagos e nas fezes de patos pode persistir de cinco dias até um ano e de dois a 75 dias, respectivamente, dependendo da temperatura e do subtipo viral (Nazir et al., 2011), pois estão protegidos da inativação pela matéria orgânica. Na água,

o vírus pode persistir até 150 dias, mas sua resistência neste meio é inversamente proporcional à temperatura e salinidade (Brown et al., 2007).

O período de incubação da doença, assim como a latência e o período infeccioso do vírus, também pode variar. Em aves individuais naturalmente infectadas este período é geralmente entre três e cinco dias (OIE, 2009a), podendo variar também de dois a seis dias (Mannelli et al., 2007) e de um a quatro dias (Tiensin et al., 2007). O período de incubação em um lote/granja/criação pode ser maior. Durante uma epidemia de HPAI H7N1 na Itália, o período de incubação em uma granja de poedeiras foi estimado em 18 dias (Capua & Terregino, 2009).

As aves infectadas por subtipos de LPAIV tendem a apresentar sinais clínicos restritos ao trato respiratório e intestinal. Uma rápida curva epidêmica em aves infectadas por LPAIV é verificada com uma duração média de infecção de 50 a 60 dias e geralmente sem mortes (Hénaux et al., 2010). Em frangos de corte, os sinais podem ser até inaparentes e quando presentes se caracterizam por anorexia, desconforto respiratório, estertores e tosse leve. Nos perus, por serem mais sensíveis que as galinhas, o quadro clínico pode incluir severa depressão, conjuntivite e enfisema subcutâneo (Capua & Terregino, 2009; Swayne & Halvorson, 2003).

Casos de HPAI geralmente envolvem disseminação viral sistêmica com alta mortalidade. A doença pode ser superaguda, causando morte súbita, ou aguda (morte em três dias). Os principais sinais clínicos das aves doentes são prostração, paralisia, congestão e cianose de cristas e barbelas, hemorragias, edema periorbital, descarga nasal e ocular e diarréia. Patos, marrecos e gansos tendem a ser mais resistentes, mas algumas cepas de alta patogenicidade podem causar distúrbios neurológicos com apresentação de torcicolo,

opistótono, incoordenação, tremores e convulsões (Capua & Terregino, 2009; Swayne & Halvorson, 2003).

C) Diagnóstico, controle e prevenção

Várias técnicas para detecção e identificação do vírus da influenza são disponíveis (Petric et al., 2006). Métodos laboratoriais padrões são baseados no isolamento do vírus em cultura de células ou em ovos embrionados (Swayne et al., 1998; OIE, 2009a). A identificação confirmatória do vírus isolado pode ser realizada através do teste de imunofluorescência, imunodifusão em ágar gel ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (Beard, 1970; Johnston & Siegel, 1991; Johnston & Bloy, 1993). O ELISA tem sido aceito como teste de triagem (Coonrod et al., 1988; Shafer et al., 1998; OIE, 2009a). Essas técnicas têm sensibilidade e especificidade limitadas para detecção do vírus da influenza A, sendo mais utilizadas para a detecção e quantificação dos níveis de anticorpos (van Voris et al., 1985).

Testes de Inibição da Hemaglutinação (HI) são utilizados para subtipificar o AIV ou analisar variações antigênicas (Schweiger et al., 2000). Alternativamente, a presença do vírus pode ser confirmada usando a transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e RT-PCR em tempo real com *primers* conservados e específicos para o gene da nucleoproteína (NP) ou da matriz (M) (Lee et al., 2001; Poddar, 2002; Spackman et al., 2002; Spackman et al., 2003). Além de ser um método rápido para detecção do vírus, a RT-PCR e a RT-PCR em tempo real servem para tipificação e subtipificação do vírus (Wright et al., 1995; Starick et al., 2000; Spackman et al., 2002). Estes testes são indicados para estudos epidemiológicos ou de investigações de surtos de influenza aviária (Cattoli & Capua, 2006).

Os subtipos H5 e H7 fazem parte da lista de doenças da OIE e devem ser notificados em caso de surto, para que sejam tomadas medidas para impedir a difusão do vírus. Medidas de biossegurança e vigilância ativa são importantes para prevenção de surtos.

A vacinação é capaz de proteger contra os sinais clínicos e mortalidade, reduz a disseminação do vírus e aumenta a resistência a infecções de campo, mas o vírus é ainda capaz de replicar nas aves vacinadas (Swayne, 2003; OIE, 2009a) e o surgimento de novas variantes pode ser favorecido (Lee et al., 2004). A vacinação, quando autorizada e licenciada, tem sido utilizada principalmente para controlar os surtos ou em áreas de alto risco de infecção por HPAIV. Mas, a principal forma de controle de surtos de AIV é a eliminação de aves infectadas, controle da movimentação de aves no país, desinfecção e zoneamento (OIE, 2009a).

Recentemente, programas de vigilância e monitoramento de AIV são empregados nos países da América do Sul. Anticorpos contra H9N2 foram detectados pela primeira vez na Colômbia em uma granja de frangos de corte, mas nenhum sinal clínico foi relatado e as tentativas de isolamento viral não foram bem sucedidas (Senne, 2007). Em 2006, Spackman e colaboradores relataram o isolamento de um LPAIV H7N3 (isolado em 2001) a partir de uma marreca-colorada (*Anas cyanoptera*) na Bolívia. Este mesmo H7N3 foi isolado de frangos de corte no Chile em 2002 (Rojas et al., 2002; Spackman et al., 2007), mas sofreu uma recombinação entre genes da HA e da NP transformando-se no primeiro HPAIV isolado na América do Sul e envolvendo um grande número de aves (galinhas e perus) comerciais no surto (Suarez et al., 2004; Max et al., 2007). Ainda no Chile (2007-2008), amostras de gaivotas demonstraram a presença de um H13N2 na espécie *Larus pipixcane* (gaivota-de-Franklin) e um H5N9 isolado de *L. dominicanus* (gaivotão) (Senne, 2010). E em 2009, o

H1N1 pandêmico também foi isolado no Chile em criações de perus comerciais (Kapczynski et al., 2011).

No Peru, foi isolado também um LPAIV H7N3 em um pato silvestre que demonstrou ser altamente conservado na região da HA analisada com os outros isolados de H7N3 do Chile e Bolívia, com exceção de uma substituição em um aminoácido (Gherzi et al., 2011). Além disso, em 2009, nove isolados de quatro subtipos de LPAIV (H3N8, H4N5, H10N9 e H13N2) já haviam sido isolados de aves silvestres migratórias e residentes no país (Gherzi et al., 2009).

Na Argentina, foi relatado o isolamento de um vírus H13N9 que se apresentava geneticamente separado dos H13 da América do Norte, e foi sugerido que pode haver uma única linhagem filogenética desse vírus na América do Sul (Pereda et al., 2008). Além disso, foi demonstrado o isolamento de H1N1 em uma perdiz na Argentina (Alvarez et al., 2010) e anticorpos contra AIV foram encontrados em 33% dos soros de aves silvestres aquáticas coletadas de 2006 a 2007 (Brown et al., 2010). Recentemente, dois subtipos de AIV, H6N2 e H6N8, foram relatados em marrecões (*Netta peposaca*) (Rimondi et al., 2011). Estes vírus mostraram ter uma adaptação limitada quando inoculados em aves domésticas e uma relação estreita com os subtipos já isolados da América do Sul, apoiando a idéia de evolução independente do vírus influenza A de outras latitudes, como os de origem eurasiáticas e norte-americana (Rimondi et al., 2011).

No Brasil, ainda não há o registro oficial da presença de HPAIV em aves domésticas. Porém, durante uma coleta de amostras (*pools* de suabe) de aves silvestres e de subsistência entre 2006 e 2007, LPAIV H3 (subtipo N não determinado) foi isolado de quatro amostras de galinhas domésticas e de três de aves silvestres da ordem Charadriiformes (*Arenaria interpres*, *L. dominicanus* e *Calidris pusilla*) na região norte e nordeste do país (Senne, 2010).

Também já foi demonstrado que Passeriformes migrantes e residentes de São Paulo das espécies *Elaenia mesoleuca* (voa pelo hemisfério sul), *Vireo olivaceus* (migra dos EUA para o Brasil) e *Sporophila caerulescens* são transportadores do vírus influenza (Kawamoto et al., 2005; Soares et al., 2005). Em 2001, Oliveira e colaboradores avaliaram a presença de anticorpos contra os subtipos H1N1 e H3N2 em aves domésticas e silvestres do Rio de Janeiro e verificaram uma frequência de positividade de 26,6%.

Recentemente, foi verificada a presença de anticorpos contra os subtipos H5, H7 e H9 em aves silvestres de vida livre atendidas em um hospital veterinário em Jaboticabal no estado de São Paulo (Sousa et al., 2013). Todas as 11 espécies analisadas eram de aves silvestres residentes e comuns em quase todos os estados do Brasil, inclusive no RS.

No RS, em um inquérito realizado em aves migratórias no PNLP, houve isolamento viral de AIV em quatro *pools* de amostras de suabe de cloaca. Destes, foram identificados os subtipos H2 e H4, sendo H2 em *pools* de dez espécies diferentes e H4 em *pools* de 12 espécies diferentes. Duas aves da espécie *Sterna hirundo* (trinta-réis-boreal) onde foi isolado o vírus do tipo H2 eram de aves com anilhas dos EUA (Araújo et al., 2004).

O Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), desenvolveu um plano de contingência e estratégias de enfrentamento da influenza aviária. Neste plano estão descritas ações de fiscalização de mercadorias, vigilância epidemiológica em abatedouros e aves migratórias e controle de movimentação de aves e produtos (MAPA, 2009).

D) Surtos de H5N1 em aves de subsistência

Nesta seção é descrita uma breve análise dos surtos de HPAIV H5N1 em aves de subsistência notificados entre os anos de 2005 e 2012 através de pesquisa realizada no site da

Organização Internacional de Saúde Animal (OIE). O critério para a seleção foi a utilização somente dos dados de relatórios de notificação imediata (*Immediate notification report*) em surtos de H5N1 ocorridos em criações de aves de subsistência e que continham informações completas.

Os dados foram compilados em um banco de dados do programa *Microsoft Access* e após exportados para o *Microsoft Excel* para análise. Com as informações recolhidas foi possível estimar a morbidade, mortalidade e letalidade de cada surto do vírus nas criações de aves de subsistência.

Um total de 115 casos de HPAIV, envolvendo 33 países em três continentes, foi selecionado pelos critérios estipulados e analisados. Destes, em 103 foi confirmada a presença do H5N1, enquanto que nos demais apenas o tipo de hemaglutinina do agente causal foi informado (H5).

A maioria dos surtos aconteceu nos países do continente asiático (62,6%), onde 19 países notificaram a presença da doença. Na África e na Europa foram sete países envolvidos em cada com 22,6% e 14,8% do total de casos, respectivamente. Este padrão de acontecimentos pode estar relacionado ao tipo de ave afetada (criações de subsistência são mais comuns na Ásia), ao fato do vírus já estar circulando nas aves daquela região há mais tempo (caso inicial no mundo em 1997, em Hong Kong), ao nível de biosegurança nestes países, bem como sistema de vigilância e notificação. Gilbert e colaboradores (2008) analisaram a associação entre a presença do vírus H5N1 com variáveis ambientais na Ásia. A abundância de patos domésticos, em particular os de pastoreio que se alimentam em áreas de cultivo de arroz, e a população humana têm sido identificadas como os principais fatores de risco para disseminação do vírus nestes locais (Gilbert et al., 2008)

No ano de 2006, foi quando ocorreu o maior número de surtos (38,3%) e envolveu principalmente os países africanos. Em 2011, todos os 25 casos ocorreram na Ásia. Em relação à distribuição mensal dos surtos, parece haver uma sazonalidade em que o número de surtos é alto nos meses de janeiro até abril, tende a diminuir no meio do ano e aumentar novamente em novembro e dezembro.

Os dados de morbidade, mortalidade e letalidade também puderam ser calculados a partir das informações do número de aves suscetíveis, afetadas e mortas. A morbidade e a mortalidade médias calculadas para aves de subsistência expostas ao risco foram de 30% e 28%, respectivamente. Por se tratar de um vírus da influenza aviária que causa uma doença com sinais clínicos graves, a letalidade média ficou em 94% nos casos analisados.

Grande parte das notificações não continha informações sobre a possível fonte de infecção do vírus nas aves de subsistência, sendo que este dado estava presente em menos de 43% dos casos. Das notificações que sugeriam uma origem para os surtos, apenas duas formas de infecção foram apontadas: a movimentação ilegal de aves (65,3%) e o contato com aves silvestres (34,7%).

2.3.2. Doença de Newcastle

O vírus da doença de Newcastle (NDV), também designado como paramixovírus aviário tipo 1 (*avian paramixovirus type 1 - APMV-1*), causa uma enfermidade infecciosa aguda de rápida difusão e altamente contagiosa que infecta uma variedade de aves domésticas e selvagens (Back, 2004). Os primeiros relatos da doença de Newcastle aconteceram em 1926 na Indonésia e em Newcastle upon Tyne, na Inglaterra (Alexander, 2003). No Brasil, a doença passou a ser relatada a partir da primeira descrição em 1953, no Amapá (Arns et al., 2007). Em 2003, o país foi considerado livre da doença, com o

último caso registrado em 2001. Entretanto, em 2006 três focos do NDV foram registrados no Brasil nos municípios de Vale Real (RS), Manaus (AM) e Lambari D'Oeste (MT). Estes focos envolveram aves de subsistência e as ações de vigilância e erradicação foram aplicadas nos locais (Paulillo & Doretto Jr, 2009).

A) Etiologia

O NDV pertence ao gênero *Avulavirus*, subfamília *Paramyxovirinae* da família *Paramyxoviridae* (ICTV Master Species List, 2012). Neste gênero estão os paramixovírus aviários do sorotipo 1 (NDV) até o sorotipo 9, que se caracterizam por conterem um envelope lipoprotéico e um genoma RNA de fita simples (Alexander, 2003).

O genoma de NDV codifica seis proteínas virais: RNA polimerase dependente de RNA (L), glicoproteína hemaglutinina-neuraminidase (HN), glicoproteína de fusão (F), proteína da matriz (M), fosfoproteína (P) e nucleoproteína (N) (Seal et al., 2000). As glicoproteínas do envelope HN e F são responsáveis pela adsorção e fusão do envelope viral na célula do hospedeiro, respectivamente. A HN apresenta atividade hemaglutinante e de neuraminidase (clivagem do receptor celular). As proteínas N, P e L, juntamente com o RNA, formam o nucleocapsídeo e exercem funções de proteção, polimerase e replicase do genoma. Enquanto que a proteína mais abundante, a proteína M, interage com o envelope e com o nucleocapsídeo, sendo importante para a formação do vírion (Alexander, 2003; Arns et al., 2007; Lamb & Parks, 2007).

A patogenicidade dos isolados de NDV é variada e, por isso, são classificados em três patotipos: os velogênicos (viscerotrópico e neurotrópico), que possuem alta patogenicidade com sinais clínicos severos e alta mortalidade; os mesogênicos, que são moderadamente patogênicos com baixa mortalidade e sinais clínicos mais brandos; e os lentogênicos, com

patogenicidade baixa ou apatogênicos (Back, 2004). Esta diferença na virulência do NDV é devido à sequência de aminoácidos no sítio de clivagem do precursor da glicoproteína F (F0). Estudos têm confirmado a presença de múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem de F0 em vírus com alta patogenicidade (Toyoda et al., 1987; Collins et al., 1993).

B) Aspectos epidemiológicos e apresentação da doença

A infecção, natural ou experimental, por NDV já foi demonstrada em pelo menos 241 espécies, o que engloba mais da metade das 50 ordens de aves existentes (Alexander, 2009). Porém, há uma variação considerável na apresentação da doença em diferentes espécies. Nos pombos, a infecção é denominada como sendo causada por paramixovírus de pombo tipo 1 (PPMV-1), por causa da diferença com o NDV no perfil de ligação aos anticorpos (Collins et al., 1989).

Em uma infecção experimental com uma cepa virulenta, o NDV parece não estabelecer infecção em patos mesmo na dose mais elevada utilizada. Perus excretaram o vírus até o quarto dia após a inoculação de doses elevadas, mas nenhuma morte foi registrada. Em contraste, as galinhas demonstraram ser extremamente suscetíveis à infecção e todos os frangos infectados morreram (Aldous et al., 2010).

A transmissão do NDV é realizada através da inalação ou ingestão de partículas virais, por aves suscetíveis, que se espalham a partir das excreções respiratórias ou fezes de uma ave infectada. Durante a infecção, grandes quantidades de vírus são eliminadas nas fezes e sua ingestão resulta no principal método de espalhamento de cepas entéricas (Alexander, 2003; Roy & Venugopalan, 2005; Shim et al., 2011).

A partir de um surto de NDV ocorrido nos EUA, foi possível a detecção do vírus em amostras de ar coletadas a dois metros da criação de aves infectadas (Hietala et al., 2005). Em

uma infecção experimental, a presença do vírus em aves suscetíveis expostas ao aerossol de aves experimentalmente infectadas por NDV foi detectada do dia seis ao dia 33 pós-exposição (Li et al., 2009). Nas aves inoculadas o vírus foi detectado a partir do segundo dia pós-inoculação até o dia 40 (Li et al., 2009).

Já foram registrados casos de morte por NDV em embriões e pintos de um dia (Pospisil et al., 1991; Capua et al., 1993; Roy & Venugopalan, 2005), mas a transmissão vertical permanece controversa. Ovos contaminados com fezes de aves infectadas poderiam servir de fonte para essa infecção precoce (Alexander, 2003; Roy & Venugopalan, 2005). Pintos infectados também podem ser provenientes de ovos infectados com vírus vacinais ou outro vírus lentogênico que não necessariamente cause a morte do embrião (Alexander, 2003).

Basicamente, as seguintes fontes de infecção podem estar envolvidas na transmissão de NDV: i) movimentação de aves vivas; ii) contato com outros animais; iii) movimentação de pessoas e equipamentos; iv) movimentação de produtos agrícolas; v) disseminação pelo ar; vi) ração e água contaminadas; e vii) vacinas (Alexander, 2003). Além disso, aves migratórias têm um papel importante como reservatórios e fontes de infecção, e têm sido implicadas como responsáveis por focos de cepas virulentas de NDV e introdução do vírus em criações de aves domésticas (Alexander et al., 1998; Takakuwa et al., 1998; Alexander et al., 1999; Jorgensen et al., 1999; Alexander, 2011).

Os seres humanos também podem ser infectados na conjuntiva pelo NDV, o que causa uma conjuntivite auto-limitante e sem conseqüências permanentes (Capua & Alexander, 2004). Isto poderia representar uma forma de transmissão do vírus, mas o mais provável e aceito é que os humanos possam propagar o NDV através do carreamento mecânico do material infeccioso (principalmente fezes de aves infectadas) (Alexander, 2003).

O tempo para os sinais clínicos aparecerem pode variar dependendo da cepa viral, a espécie hospedeira, idade e estado imune do hospedeiro, presença de co-infecções, condições ambientais, a via e a dose infectante (Alexander, 2003). O período de incubação da doença de Newcastle após uma exposição natural varia de dois a 15 dias (com média de cinco a seis dias), e em algumas espécies pode se prolongar por mais de 20 dias (OIE, 2009b). Porém, já foi demonstrada infecção latente por NDV durante 70 dias, e que em alguns casos, assumiram uma forma aguda e tornaram-se aparentes (Gerganov, 1978).

NDV velogênicos causam uma doença aguda que afeta aves de todas as idades e categorias com início repentino dos sinais clínicos e alta mortalidade. Algumas aves morrem antes mesmo da apresentação clínica da doença (Terregino & Capua, 2009; Paulillo & Doretto Jr, 2009). Aves poedeiras podem apresentar queda acentuada na produção de ovos ou ausência total da postura (Alexander, 2003; Back, 2004). Dependendo do tropismo dessas cepas velogênicas, os sinais clínicos podem ocorrer predominantemente no trato gastrointestinal (viscetrópica), que leva a uma grave enterite com presença de diarreia (Terregino & Capua, 2009; Alexander, 2003; Paulillo & Doretto Jr, 2009). Já as formas neurotrópicas causam uma doença que afeta o sistema respiratório e o sistema nervoso central e sinais como dificuldade respiratória grave, torcicolo, paralisia, incoordenação motora e depressão estão presentes (Terregino & Capua, 2009; Alexander, 2003; Paulillo & Doretto Jr, 2009).

Os vírus mesogênicos podem causar queda na postura e/ou ovos disformes, descoloridos e de casca fina, dificuldade respiratória moderada, diminuição no consumo de alimentos e em aves jovens, mortalidade média com sinais nervosos (Terregino & Capua, 2009). Patotipos lentogênicos podem provocar sinais clínicos respiratórios leves em aves

jovens, mas geralmente são assintomáticos em aves adultas e, por isso, utilizados na composição de vacinas vivas (Terregino & Capua, 2009; Back, 2004).

Aves aquáticas, embora sejam suscetíveis à infecção por NDV, são altamente resistentes às manifestações clínicas da doença (Shengqing et al., 2002; Kim et al., 2007). Quando presentes, os sinais são anorexia, diarreia branca, corrimento nasal e ocular, e em casos mais graves, torcicolos, tremores e paralisia muscular (Glaser et al., 1999; Liu et al., 2008).

Aves migratórias podem ser reservatórios de NDV e fonte de introdução do vírus para aves domésticas (Alexander et al., 1998; Takakuwa et al., 1998; Alexander et al., 1999; Jorgensen et al., 1999; Alexander, 2011; Hoque et al., 2012). No Brasil, NDV de baixa patogenicidade (lentogênico) já foi detectado em aves silvestres do norte e nordeste do país (Thomazeli et al., 2012).

C) Diagnóstico, controle e prevenção

O diagnóstico para a doença de Newcastle pode ser realizado pela identificação do agente ou através de testes sorológicos (HI e ELISA), como indicado no manual de testes de diagnóstico e vacinas para animais terrestres da OIE (OIE, 2009b). A inoculação em ovos embrionados ou em cultura de células e a posterior identificação com Reação de Hemoaglutinação (HA) e HI são classicamente utilizadas e se caracterizam por ser o método mais seguro para comprovação de uma suspeita. No isolamento podem ser utilizados órgãos de aves mortas ou suabe de cloaca e/ou traquéia (OIE, 2009b). O HI pode ser realizado com anticorpos monoclonais (MAbs), o que reduz possíveis reações cruzadas, que podem acontecer com soros policlonais, com outros paramixovírus aviários (Collins et al., 1998; Alexander, 2003).

Os índices de patogenicidade são utilizados para confirmação da identificação viral e avaliação da virulência da cepa. Três índices podem ser utilizados: índice de patogenicidade intracerebral (IPIC), tempo médio de morte embrionária (TMME), e índice de patogenicidade intravenosa (IPIV), porém a OIE recomenda somente o IPIC. O IPIC pode variar de 0 (vacinal) a 2 (altamente patogênicas), mas para uma amostra ser caracterizada como uma infecção por NDV virulento o IPIC deve ser maior que 0,7 (OIE, 2009b). O TMME para amostras velogênicas é menos de 60 horas, para as mesogênicas é entre 60 e 90 horas, e em amostras lentogênicas o tempo é mais de 90 horas para a dose letal mínima matar todos os embriões inoculados. Em relação ao IPIV, que é a pontuação média recebida por ave inoculada, amostras lentogênicas e algumas mesogênicas apresentam pontuação zero, enquanto que amostras velogênicas podem chegar até 3 (Back, 2004; Paulillo & Doretto Jr, 2009).

Além do IPIC, outra forma de se avaliar a patogenicidade de uma amostra de NDV é através de técnicas de biologia molecular para determinar a sequência do sítio de clivagem da F0. Múltiplos resíduos de aminoácidos básicos entre os aminoácidos 113 e 117 da proteína confirmam a presença de uma cepa virulenta ou potencialmente virulenta (Aldous & Alexander, 2001; Aldous et al., 2003).

O diagnóstico da presença de NDV também pode ser realizado de forma mais rápida através de técnicas moleculares, como RT-PCR e RT-PCR em tempo real em órgãos e suabe de traquéia e cloaca. O alvo para amplificação podem ser regiões conservadas da matriz ou da proteína F (Gohm et al., 2000; Aldous et al., 2001; Wise et al., 2004).

O controle da disseminação da doença acontece com estratégias de contenção do foco, como remoção das fontes de infecção (aves, produtos), quarentena, controle do trânsito de

animais, descontaminação, vigilância e zoneamento (Paulillo & Doretto Jr, 2009). Já a prevenção é realizada com medidas de biossegurança e vacinação.

Vacinas vivas são de amostras de NDV lentogênico, sendo que as mais comumente utilizadas no mundo e no Brasil são a Hitchner B1 (IPIC 0,2) e a La Sota (IPIC 0,4) (Seal et al., 2000; Alexander, 2003). Estas vacinas vivas são utilizadas em pintos com um dia e induzem níveis elevados de IgA, IgG e IgM no soro, secreções (lágrima) e glândula de Harder (Russell, 1993; Russell & Ezeifka, 1995). Os anticorpos podem ser detectados no soro de cinco a 10 dias após a vacinação e um reforço é recomendado até três semanas após a primovacinação (Russell & Ezeifka, 1995; Borne & Comte, 2003). Cepas vacinais assintomáticas com tropismo entérico (IPIC zero) também estão disponíveis e podem ser utilizadas com o benefício de não causar reações pós-vacinais (van Eck & Goren, 1991).

Vacinas inativadas são geralmente utilizadas como reforço da aplicação da vacina viva na recria e antes do início da postura em matrizes para induzir imunidade mais duradoura (Back, 2004). A administração de uma vacina viva e uma inativada na primeira semana oferece proteção por aproximadamente 10 semanas (Borne & Comte, 2003). Além disso, a passagem de anticorpos maternos aos pintos (proteção de 75% a 50% durante as primeiras duas semanas) também é beneficiada com a aplicação da vacina inativada (Borne & Comte, 2003; Back, 2004).

NDV está incluído como patógeno de importância no PNSA do MAPA. Foi demonstrada uma soroprevalência contra NDV em frangos de corte, nas regiões produtoras e exportadoras de frango, de 28,8 a 39,1%. Nas granjas positivas foram isoladas amostras virais com padrão não-patogênico, preservando assim o status de livre de NDV virulento em granjas comerciais no Brasil (Orsi et al., 2010a e 2010b). Além disso, a caracterização biológica dos

isolados de aves migratórias mostram que há circulação de vírus de baixa e alta patogenicidade nestas aves no país (Orsi, 2010).

2.3.3. Micoplasmose – *Mycoplasma gallisepticum*

O *Mycoplasma gallisepticum* (MG) é o mais patogênico e economicamente importante dos micoplasmas que afetam aves. Infecções por MG causam uma doença respiratória crônica em frangos e uma sinusite infecciosa em perus (Stipkovits & Kempf, 1996).

A primeira descrição da infecção por MG foi em perus na Inglaterra no ano de 1905. Em 1935, a bactéria foi associada a uma coriza infecciosa em galinhas. A partir daí, o isolamento dos microorganismos originados de galinhas e perus em ovos embrionados foi possível, e a classificação como membro do gênero *Mycoplasma* ocorreu em 1952 (Ley, 2003).

A) Etiologia

As bactérias do gênero *Mycoplasma* são membros da família Mycoplasmataceae, ordem Mycoplasmatales, da classe dos Mollicutes. Este gênero possui mais de 100 espécies de bactérias que ocorrem em seres humanos e animais (Kleven, 2003).

Os micoplasmas são Gram negativos que se coram por Giemsa, de formato cocóide, cocobacilar ou pleomórficos e com genoma pequeno de tamanho entre 600 a 1350 kb. Sua membrana é constituída de proteínas e lipídeos. Os polipeptídeos estão associados à variação antigênica, adesão às células dos hospedeiros e transporte de nutrientes (Razin et al., 1998; Noormohammadi, 2007). Além disso, proteínas do MG têm sido descritas como antígenos com propriedades de adesina ou hemaglutinina, que desempenham papéis importantes na patogênese da infecção e resposta imunológica (Czifra et al., 1993; Bencina, 2002).

A sobrevivência do micoplasma no hospedeiro é devida a mecanismos de patogenicidade e inibição do sistema imunológico, que incluem adesão em células alvo, indução de apoptose ou morte celular, mimetismo molecular que pode levar à tolerância (Razin et al., 1998, Kleven, 2003; Noormohammadi, 2007).

B) Aspectos epidemiológicos e apresentação da doença

A infecção ocorre principalmente em galinhas e perus, mas a doença já foi descrita em outras aves domésticas (Bencina et al., 1987; Cookson & Shivaprasad, 1994; Sprygin et al., 2010) e também em aves silvestres (Bozeman et al., 1984; El Shater, 1996; Dhondt et al., 1998; Duckworth et al., 2003). As aves silvestres migratórias serviriam como hospedeiros ocasionais ou mecânicos de MG (Hubálek, 2004), mas, possivelmente, a bactéria seria capaz de causar uma mudança na estrutura migratória (Hurtado, 2008). MG pode infectar aves em todas as idades, mas as aves jovens são consideradas mais suscetíveis e apresentam um quadro clínico mais severo da doença (Kleven, 2003).

A transmissão pode acontecer de forma horizontal e vertical. A transmissão horizontal acontece pelo contato de aves suscetíveis com aves com infecção clínica ou subclínica, ou com fômites (alimento, pessoas, cama de aviário, entre outros) contaminados, já que a porta de entrada da bactéria é principalmente pelo trato respiratório e/ou conjuntiva (Sato, 1996; Kleven, 2003). McMartin e colaboradores (1987) descreveram que a disseminação horizontal de MG dentro de uma granja aconteceria em quatro fases: a fase 1 (12 a 21 dias) seria a fase latente; a fase 2 (1 a 21 dias) é um período em que a infecção começa a aparecer gradualmente em 5% a 10% das aves; na fase 3 (7 a 32 dias após a infecção) o restante das aves desenvolvem anticorpos; e a fase 4 (3 a 19 dias) é a fase terminal onde toda a população de aves torna-se positiva.

A transmissão transovariana é considerada a principal rota de disseminação da bactéria, pois o MG pode ser transportado por longas distâncias no ovo ou em pintos recém-nascidos (Stipkovits & Kempf, 1996). As maiores taxas acontecem quando a infecção está na fase aguda e em grande quantidade no trato respiratório das aves (Kleven, 2003).

O período de incubação em infecções experimentais varia de seis a 21 dias, mas a sinusite em perus pode aparecer em até 10 dias (Kleven, 2003). Em condições naturais tem se observado que aves infectadas *in ovo* desenvolvem a infecção em torno de seis a 10 dias, enquanto que na transmissão horizontal são necessários de 15 a 21 dias para o início da infecção (Nascimento & Almeida, 2009).

Os perus são mais suscetíveis ao MG do que frangos, e geralmente desenvolvem um quadro clínico mais grave. Os sinais clínicos mais característicos são tosse, descarga nasal, sinusite, aerossaculite, redução no consumo de alimentos, perda de peso e diminuição na produção de ovos em poedeiras e matrizes (Levisohn & Kleven, 2000; Kleven, 2003; Kleven et al., 2004). Em frangos de corte, a maioria dos surtos ocorre entre quatro e oito semanas de idade, mas em alguns lotes os sinais clínicos podem não ser evidentes mesmo com a presença de anticorpos (Kleven, 2003).

C) Diagnóstico, controle e prevenção

A presença de MG pode ser confirmada por isolamento da bactéria em meios de cultura adequados ou pela detecção direta em tecidos infectados (sacos aéreos e traquéia) através de imunofluorescência indireta, imunoperoxidase, teste de inibição do crescimento, PCR e PCR em tempo real (Callison et al., 2006; OIE, 2008). Outras amostras que podem ser coletadas para identificação são exsudato e líquido sinovial e ocular, e suabes de traquéia e

sacos aéreos (Nascimento & Almeida, 2009). Além disso, nos tecidos de ovário e oviduto ou testículos a presença da bactéria também pode ser verificada (Stipkovits & Kempf, 1996).

Testes sorológicos também são amplamente utilizados para o diagnóstico de MG, mas principalmente aplicados no monitoramento ou diagnóstico de rebanho (OIE, 2008). As provas sorológicas mais comumente utilizadas são a soroaglutinação rápida (SAR), a HI e o ELISA.

O controle do MG consistiu em três abordagens principais: manutenção de lotes livres da infecção, medicação, e vacinação (Kleven, 2008). A manutenção de lotes livres consiste na reposição de aves livres de MG e com idade única, e um sistema de manejo *all-in all-out* (Kleven, 2003; Kleven, 2008). Medidas de biossegurança e um programa de monitoramento efetivo também são aspectos necessários que devem ser aplicados para conservação de lotes livres (Levisohn & Kleven, 2000). Em granjas em que a infecção está presente, a eliminação de aves contaminadas, principalmente de reprodutoras, pode ser aplicada (Back, 2004).

A medicação pode ser útil para prevenir os sinais clínicos e lesões, bem como as perdas econômicas, mas não elimina a infecção de uma granja e é pouco efetiva no controle da transmissão vertical (Back, 2004; Kleven, 2008). O tratamento pode ser feito através da água ou ração com antimicrobianos macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (Back, 2004; Kleven, 2008).

A vacinação contra a MG pode ser uma boa solução em longo prazo em situações nas quais a manutenção de lotes livres não é possível, especialmente em granjas com aves de postura ou com aves de idades variadas (Kleven, 2008). Vacinas vivas atenuadas (amostras F, 6/85 e ts-11) e inativadas estão disponíveis no Brasil para utilização em poedeiras (Nascimento & Almeida, 2009).

2.4. Modelagem de espalhamento de doenças infecciosas

Modelos epidemiológicos têm se tornado uma ferramenta importante para análise de consequências e elaboração de programas de controle de doenças infecciosas, pois é difícil de determinar a eficiência das medidas de controle ou programas de vigilância somente a partir dos resultados obtidos de experiências de campo. Além disso, podem fornecer dados para pesquisa de doenças onde o patógeno está ausente ou onde a realização de experimentação ou coleta de dados de campo é impossível (Thrusfield, 2004; Massad et al., 2010).

Naturalmente, estes modelos são uma simulação simplificada da realidade e não descrevem os mecanismos de transmissão e propagação de infecções com muitos detalhes, mas contêm parâmetros que podem ser estimados, e ser suficientes para explicar um processo infeccioso (Stegeman et al., 2011). Várias abordagens são utilizadas para modelagem da dinâmica de transmissão de doenças infecciosas. Nesta tese, duas abordagens foram utilizadas conjuntamente para simular uma modelagem de espalhamento do HPAIV: SIR e redes.

O modelo SIR assume que uma população de aves consiste em aves suscetíveis (S), infecciosas (I) e recuperadas ou mortas (R) (Kermack & McKendrick, 1927). Este modelo é bastante utilizado para modelagem da dinâmica de transmissão de doenças infecciosas. O parâmetro de quando uma unidade suscetível é infectada é expresso pela taxa de transmissão β , que é definida como o número médio de novas infecções causadas por um indivíduo infectado por uma unidade de tempo em um período infeccioso determinado (Stegeman et al., 2011). A partir desses dados é possível calcular a taxa reprodutiva básica (R_0), que é o número esperado médio de casos secundários produzidos por um típico caso preliminar em uma população inteiramente suscetível (não imune). A R_0 é o parâmetro chave do modelo, pois avalia se uma doença não está se propagando ($R_0 < 1$), se propaga de forma endêmica ($R_0 = 1$) ou ela se propaga de forma epidêmica ($R_0 > 1$) (de Jong & Diekmann, 1992;

Heffernan et al., 2005). A R_0 é também utilizada para avaliar o risco de uma epidemia ou pandemia de uma doença infecciosa emergente (Heffernan et al., 2005).

Tradicionalmente, o modelo SIR, assim como outros modelos epidemiológicos, assume que cada unidade da simulação (animal ou propriedade) tem a mesma probabilidade de contato com as outras unidades. Porém, isto não é uma realidade, já que algumas unidades podem ter mais chance de contato ou interação entre si do que com outras (Ossada, 2011). Devido a isto, a utilização de métodos de análise de rede pode investigar mais precisamente o contato entre as unidades e analisar os efeitos desta estrutura na disseminação de uma doença (Ossada et al., 2013).

No modelo de redes, cada nó ou vértice representa uma unidade (indivíduo ou propriedade) e os contatos são representados pelas arestas, sendo que as conexões entre os nós podem ser descritas através de uma matriz de adjacência (Keeling & Eames, 2005; Keeling & Rohani, 2007). As redes de contato são utilizadas na medicina veterinária para descrever o espalhamento de doenças infecciosas, padrão de movimentação de animais e avaliação de estratégias de controle (Poolkhet et al., 2013a; Poolkhet et al., 2013b).

Várias formas de redes têm sido estudadas no contexto de transmissão de doenças. Cada uma destas redes pode ser definida em termos de como os indivíduos são distribuídos no espaço (geográfica ou socialmente) e como as conexões são formadas (Keeling & Eames, 2005). As principais redes utilizadas são as redes aleatórias, as redes complexas (ou sem escala) e as redes *small world*.

Nas redes aleatórias, os nós são conectados com igual probabilidade de contato, ou seja, as conexões são formadas ao acaso e a posição espacial de indivíduos/propriedades não é relevante (Keeling & Eames, 2005; Ma et al., 2013). Nas redes complexas, é utilizado o grau de distribuição entre os nós, com muitos vértices com um baixo número de contatos e alguns

vértices com um número elevado de contatos (Keeling & Eames, 2005; Ma et al., 2013; Ossada et al., 2013). Estas redes complexas são capazes de fornecer níveis de heterogeneidade no número de contatos, importante para disseminação e manutenção das infecções (Keeling & Eames, 2005). Além disso, com a utilização de redes complexas é possível a análise de *PageRank* e *hubs* (Grisi-Filho et al., 2013a). No *PageRank* é atribuído um valor de importância para cada nó da rede, determinado pelo grau de entrada ou saída, e os *hubs* são os nós altamente conectados que coexistem com um grande número de nós com poucas conexões. As redes *small world* são construídas pela adição de ligações aleatórias entre nós que estão conectados a vizinhos mais próximos (Keeling & Eames, 2005; Ma et al., 2013).

4.1.1. Modelagem de espalhamento de HPAIV

Quantificar a transmissão e disseminação de diferentes subtipos de AIV em populações suscetíveis de diferentes espécies é importante para o delineamento de programas de controle da doença e alguns estudos têm sido realizados com esse objetivo. Simulações do espalhamento de HPAIV em aves são utilizadas para modelagem de cenários e consequências da introdução da doença em uma região.

Patyk e colaboradores (2013) estabeleceram parâmetros de entrada para simular o espalhamento de H5N1 entre aves comerciais e de subsistência nos EUA e estimar as consequências de um surto da doença nesta população e possíveis estratégias de controle. O contato indireto entre as granjas (movimentação de pessoas, equipamentos, animais ou produtos) apresentou a maior importância na transmissão da doença. O espalhamento de HPAIV entre vários tipos de instalações avícolas comerciais também foi devido às conexões feitas entre estabelecimentos por movimentação relacionada à atividade humana na Grã-Bretanha (Dent et al., 2011).

Na análise de redes em granjas de aves de subsistência na Tailândia, identificou-se uma relação estreita entre as propriedades e o mercado de aves vivas no espalhamento de H5N1 (Poolkhet et al., 2013b). Além disso, nesta mesma região, além dos criadores com aves de subsistência, outros nós que desempenharam um papel importante no espalhamento de H5N1 foram agricultores que criam tanto aves de subsistência como galos de briga, e os frequentadores de rinhas de galos (Poolkhet et al., 2013a).

Analisando a transmissão entre-granjas do HPAIV H7N1, que interrompeu a produção de aves na Itália na epidemia de 1999-2000, foram encontradas diferenças na suscetibilidade entre os tipos de produção comercial (Dorigatti et al., 2010). Além disso, simulações das medidas de controle foram implementadas, sendo que as medidas mais eficazes foram a proibição do reabastecimento de animais e um início precoce do abate preventivo.

O potencial de espalhamento do H5N1 entre explorações avícolas comerciais na Geórgia, EUA, também foi modelado (Dorea et al., 2010) e previu que a detecção da infecção pelo produtor é mais provável após o quinto dia da introdução do vírus. Neste estudo, o espalhamento foi associado mais frequentemente com a movimentação de caminhões de ração e de funcionários.

Para geração de informações sobre parâmetros que são utilizados em modelos de simulação, como dados do período de latência, período infeccioso, dose infectante e letal, vias de eliminação do vírus e transmissão (Stegeman et al., 2010), é necessário um levantamento destas informações na literatura. Estes dados podem ser obtidos a partir de trabalhos de infecção experimental (**Tabela 9**) ou de surtos (**Tabela 10**). Como estudos experimentais, geralmente, são realizados sob condições controladas, é possível determinar também o efeito de alguma medida de controle/intervenção na transmissão do vírus entre as aves.

Tabela 9- Estimativas de transmissão entre aves de subtipos de HPAIV em infecções experimentais.

Subtipo	Tipo de ave	Período de latência (dias)	Período infeccioso (dias)	β /dia	R_0	Referência
H5N1	Galinha	0,24	2,1	0,76	1,6	Bouma et al., 2009
H5N1	Galinha	1,0 - 2,0	1 - 2,8	0,9 - 2,7	1,2 - 5,6	Spekreijse et al., 2011
H5N1	Marreco	1	4,3	4,7	> 1,5	van der Goot et al., 2008
H5N1	Marreco	1	10,4	> 2,7	> 1,5	van der Goot et al., 2007
H5N1	Faisão	1	12,2	2,8	> 1,5	van der Goot et al., 2007
H5N1	Galinha	1	1,5	8	12	Poetri et al., 2009
H7N7	Peru	-	6,2	1,26	7,8	Bos et al., 2008
H7N7	Galinha	2	6,3	33	> 1,3	van der Goot et al., 2005
H5N2	Galinha	1,0 - 2,0	6,8	0,78 - 4,66	5,30 - 31,7	van der Goot et al., 2003a
H5N2	Galinha	-	-	-	infinito	van der Goot et al., 2003b

Tabela 10- Estimativas de transmissão entre e intra-rebanhos em surtos de HPAIV.

Subtipo	Tipo de granja	Ano surto	País	Alvo	R_0	Referência
H5N1	Subsistência	2006	Romênia	Entre rebanho	1,91 - 2,68	Ward et al., 2008
H5N1	Comercial	2004-2005	Tailândia	Entre rebanho	1,27 - 1,60	Marquetoux et al., 2012
H7N1	Comercial	1999-2000	Itália	Entre rebanho	1,5 - 1,8	Mannelli et al., 2007
H7N1	Comercial	1999-2000	Itália	Entre rebanho	1,2 - 2,7	Garske et al., 2007
H7N7	Comercial	2003	Holanda	Entre rebanho	3,1 - 6,5	Stegeman et al., 2004
H7N7	Comercial	2003	Holanda	Entre rebanho	0,9 - 3,0	Garske et al., 2007
H7N7	Subsistência	2003	Holanda	Entre rebanho	0,5	Bavinck et al., 2009
H7N7	Subsistência	2003	Holanda	Entre rebanho	4,8	Smith et al., 2011
H7N3	Comercial/ Subsistência	2004	Canadá	Entre rebanho	1,4 - 3,6	Garske et al., 2007
H5N1	Comercial	2004	Tailândia	Intra rebanho	2,26 - 2,64	Tiesin et al., 2007
H5N1	Subsistência	2004	Tailândia	Intra rebanho	2,18 - 2,4	Tiesin et al., 2007
H5N1	Comercial - galinha	2004-2005	Vietnã	Intra rebanho	1,90 - 2,86	Magalhães et al., 2010
H5N1	Comercial - pato	2004-2005	Vietnã	Intra rebanho	1,55 - 2,16	Magalhães et al., 2010
H5N1	Comercial	-	EUA	Intra rebanho	-	Dorea et al., 2010
H5N1	Silvestre - aquática	2005-2006	Alemanha	Intra rebanho	1,6	Penny et al., 2010
H5N1	Comercial	-	-	Intra rebanho	< 10	Savill et al., 2008
H7N7	Comercial	2003	Holanda	Intra rebanho	18	Bos et al., 2009

Van der Goot e colaboradores (2003a e 2003b), mostraram que o período infeccioso, a R_0 e a taxa β são maiores em cepas de alta patogenicidade quando comparados com os dados obtidos na inoculação de uma cepa de baixa patogenicidade em galinhas. Parâmetros de transmissão também foram analisados com a avaliação do efeito da inoculação de H5N1 em galinha (Bouma et al., 2009; Spekrijse et al., 2011), marreco selvagem e em faisão (van der Goot et al., 2007).

A quantificação do efeito de uma vacina pode ser medida através da simulação de modelos e comparação dos parâmetros de transmissão em aves vacinadas e não vacinadas. Uma redução no nível de transmissão foi verificada em galinhas selvagens (Poetri et al., 2009) e marrecos (van der Goot et al., 2008) quando vacinados contra H5N1. O mesmo aconteceu em experimentos de vacinação contra H7N7 em galinhas (van der Goot et al., 2005) e em perus (Bos et al., 2008).

O surto de HPAIV H7N7 que ocorreu na Holanda no ano de 2003 rendeu vários estudos. A R_0 entre rebanhos foi estimada em granjas de aves comerciais (Stegeman et al., 2004; Garske et al., 2007) e em domicílios com criação de aves de subsistência (Bavinck et al., 2009; Smith et al., 2011). Enquanto que transmissão intra-rebanho em granjas comerciais neste surto foi quantificada por Bos e colaboradores (2009).

Estudos de casos de surtos em aves de subsistência pelo H5N1 forneceram dados sobre o espalhamento e transmissão entre rebanhos na Romênia (Ward et al., 2008) e intra-rebanhos na Tailândia (Tiensin et al., 2007). Em aves comerciais, surtos de H5N1 em diversos países também foram detalhados (Tiensin et al., 2007; Savill et al., 2008; Dorea et al., 2010; Magalhães et al., 2010; Marquetoux et al., 2012). Penny e colaboradores (2010) demonstraram a dinâmica de transmissão de H5N1 em aves aquáticas em um lago da Alemanha durante um surto no inverno de 2005-2006. A transmissão entre rebanhos de

HPAIV também foi quantificada em surtos de H7N1 em aves comerciais na Itália (Garske et al., 2007; Mannelli et al., 2007) e de H7N3 em aves comerciais e de subsistência no Canadá (Garske et al., 2007).

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESES

A avicultura é uma atividade de importância para estado e o país e merece atenção quanto ao conhecimento da circulação de patógenos nas criações, pois o despreparo para uma eventual epidemia poderá causar prejuízos sérios para o setor. O desenvolvimento de mecanismos capazes de responder rapidamente a uma epidemia é um trabalho multidisciplinar que requer uma preparação com antecipação.

As granjas com aves de subsistência representam uma grande parcela no panorama da avicultura do estado. Diversas doenças circulantes em aves domésticas estão associadas a aves migratórias e as características peculiares das criações de subsistência tornam-as mais propensas a esses patógenos. A região do PNLP se configura em um ecótopo importante por albergar tanto aves migratórias (como sítio de invernada), como aves de subsistência. Esta interface de espécies faz da região um dos mais prováveis pontos de entrada de patógenos por aves migratórias no Brasil. Nesse sentido, a difusão destes patógenos para aves comerciais poderia causar um impacto considerável na economia. Portanto, a região do PNLP reúne as principais características para proporcionar a introdução e disseminação de um surto de influenza e outras doenças respiratórias em aves: rota de migração, abundância de aves de subsistência, baixa biossegurança, alto grau de antropização, e proximidade com granjas comerciais de aves e suínos.

O inquérito de patógenos associados a aves migratórias utilizando sentinelas se torna um indicador adequado da introdução e disseminação destes patógenos em uma região (Shin et al., 2000; Komar, 2001). Aves de subsistência poderiam servir como importantes modelos de sentinelas na região do PNLP, já que estas são criadas na ausência de biossegurança e livres para o contato com aves silvestres. Ademais, inquéritos utilizando estas como sentinelas poderiam ser tão eficazes quanto à busca ativa em aves silvestres e servir como fonte de

informação para programas de vigilância, considerando maiores facilidades como a obtenção de amostras biológicas, um cálculo amostral com população conhecida e a possibilidade da identificação de fatores de risco.

A determinação do impacto da difusão destes patógenos em aves em uma determinada região só pode ser inferida a partir de estudos de surtos, infecções experimentais ou simulações. Na ausência da doença, o impacto da possível introdução e disseminação do agente é desconhecido. Devido a isto, se faz necessárias ferramentas computacionais e matemáticas que permitam simular as possíveis consequências de um foco, considerando as características da região e as diferentes probabilidades de evolução de um surto.

Considerando o anteriormente exposto, a hipótese desta tese é que há circulação dos patógenos associados a aves migratórias (AIV, NDV e MG) no ecótopo do PNLP e que as aves de subsistência poderiam servir de sentinelas à introdução e disseminação destes agentes. No caso das aves de subsistência apresentarem os patógenos, o contato com aves migratórias/silvestres constituiria um fator de risco para a ocorrência destas enfermidades nesta região. Ademais, uma possível introdução de um HPAIV em alguma das propriedades da região da Laguna do Peixe causaria uma disseminação rápida do agente na maior parte das propriedades com aves da região.

4. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Realizar um inquérito epidemiológico de doenças respiratórias associadas a aves migratórias em aves de subsistência e propor um modelo de espalhamento de influenza aviária na região da Laguna do Peixe, Rio Grande do Sul.

Objetivos específicos:

- Realizar uma análise descritiva das propriedades da região da Laguna do Peixe com criações de aves de subsistência através da aplicação de questionários;
- Investigar a presença dos agentes e de anticorpos contra influenza aviária, Doença de Newcastle e *Mycoplasma gallisepticum* em aves de subsistência da região da Laguna do Peixe;
- Determinar os possíveis fatores de risco associados aos patógenos estudados;
- Desenvolver um modelo de espalhamento de influenza aviária de alta patogenicidade na região da Laguna do Peixe.

5. PARTE EXPERIMENTAL & RESULTADOS

5.1. Capítulo I – Inquérito epidemiológico

Neste capítulo, descreve-se o inquérito epidemiológico de doenças respiratórias associadas a aves migratórias - influenza aviária (AI), Doença de Newcastle (ND) e *Mycoplasma gallisepticum* (MG) – em aves de subsistência de propriedades localizadas dentro ou próximas ao Parque Nacional da Lagoa do Peixe, RS. Este inquérito foi planejado e desenhado direcionado para avaliar a presença de AI nas aves de subsistência. Após as coletas, as amostras e as informações adquiridas foram utilizadas para o inquérito de outras doenças também associadas a aves migratórias (ND e MG). Foi realizado sorologia para as três doenças, a fim de avaliar a circulação de anticorpos contra os agentes na região. Além disso, para AI e ND, também se realizou o diagnóstico molecular para detecção da presença dos vírus. A detecção molecular foi realizada somente para AI e ND para ser possível a diferenciação genética em cepas de baixa e alta patogenicidade no caso de alguma amostra ser positiva, o que não seria necessário para MG.

5.1.1. Metodologia

A) Amostragem e coleta dos dados e amostras

A população alvo selecionada foram propriedades onde há criação de aves de subsistência e que estão localizadas na região do Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP). Esta região se caracteriza por ser uma área úmida de importância como sítio de invernada para aves migratórias vindas, principalmente, do hemisfério norte.

Uma lista contendo o nome dos moradores, município, localidade, coordenadas geográficas e número de aves criadas em cada domicílio foi utilizada para o cálculo e método

de amostragem. Todas as propriedades localizadas num raio de 3,5 km de qualquer lagoa ou área úmida e com pelo menos duas aves foram incluídas para o cálculo de amostragem (N=131 propriedades) (Figura 5).

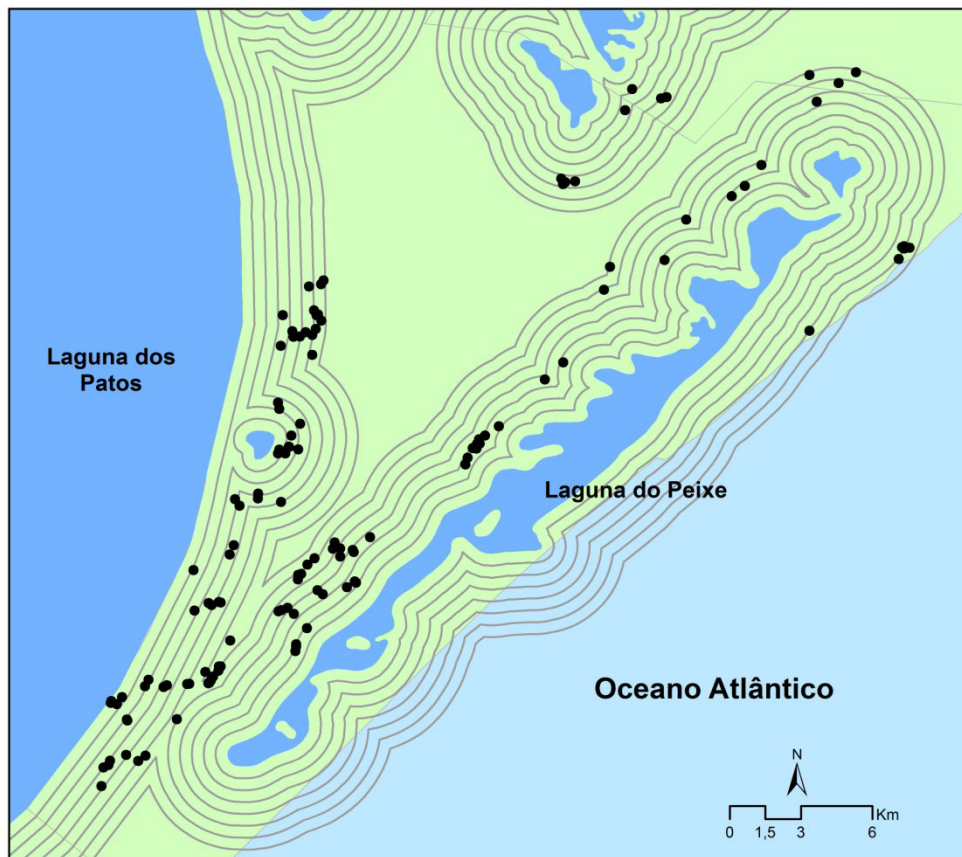


Figura 5- Geolocalização das propriedades incluídas no cálculo de amostragem (N=131). Cada linha representa a distância de 0,5 km.

A amostragem foi realizada em dois estágios, no qual no primeiro a propriedade era a unidade de interesse para determinação da presença do agente ou de anticorpos. Este desenho amostral foi direcionado para a detecção de AIV nas aves de subsistência da região. O número de propriedades ($n_1=48$) foi determinado por uma amostragem utilizando distribuição hipergeométrica realizada para detectar, com uma probabilidade de 95%, pelo menos um

domicílio positivo, considerando uma prevalência de propriedade 5%. O valor de prevalência foi selecionado com o intuito de detectar a presença da infecção na população, e não para estimar a prevalência do agente na população. As propriedades foram sorteadas de forma aleatória simples. No segundo estágio da amostragem, o número de aves a serem coletas em cada domicílio ($n_2=9$) foi determinado por um processo binomial considerando uma prevalência intra-rebanho de 30% e uma probabilidade de 95% de detectar pelo menos uma ave positiva na propriedade. As aves foram coletadas de forma sistemática dentro de cada propriedade.

As visitas nas propriedades foram realizadas no mês de Dezembro. Esta escolha se deu por duas razões: (i) o período no qual a maior quantidade de aves migratórias neárticas concentra-se no PNLN inicia-se em Novembro (estendendo-se até Abril); e (ii) no período das festas de fim de ano (Natal e Ano Novo) há tradicionalmente uma significativa redução do plantel de aves de subsistência nas propriedades da região, por consumo próprio ou venda.

Foram coletadas amostras de suabe de traquéia e cloaca das aves selecionadas para realização da detecção molecular do vírus e amostras de sangue para detecção de anticorpos (**Figura 6**). As amostras de suabes foram acondicionadas em meio com isotiocianato de guanidina (para lise viral) e mantidas a -80°C até sua utilização. Análises realizadas previamente mostraram que a adição de isotiocianato de guanidina em amostras padrão virais (positivas para a presença do genoma de AIV ou NDV) não interfere na extração do RNA ou na amplificação do gene dos vírus na RT-PCR (dados não apresentados).

A coleta de amostras de sangue foi realizada através de punção na veia braquial em tubos sem anticoagulante. As amostras foram acondicionadas e mantidas a temperatura ambiente para formação do coágulo. O soro foi colhido e mantido a -20°C até a utilização. As coletas foram realizadas com o uso de equipamento de proteção individual (EPI) descartável

completo, exclusivos para cada propriedade. Todo material utilizado na coleta ou processamento das amostras (EPI, pipetas, tubos, etc.) foi adequadamente acondicionado e esterilizado (por autoclavagem) antes de serem descartado.



Figura 6- Coleta das amostras clínicas. Painel A: coleta de suabe de traquéia. Painel B: coleta de suabe de cloaca. Painel C: coleta de sangue através da punção da veia braquial.

Um questionário epidemiológico foi desenvolvido e aplicado juntamente com a coleta das amostras clínicas para avaliação dos possíveis fatores de risco associados nas propriedades selecionadas. O questionário incluiu questões relacionadas a informações gerais do domicílio, características da produção, origem das aves e medidas de biossegurança (**Tabela 11**). Além disso, a geolocalização foi registrada através de aparelho utilizando sistema de posicionamento global (*global positioning system*, GPS).

Tabela 11- Resumo das questões do questionário epidemiológico

Nível	Informação
Informações gerais da propriedade	Localização geográfica Número de habitantes Escolaridade
Características da produção animal	Número de aves Espécies de aves Presença de animais de estimação Presença de animais de produção
Informações sobre biossegurança na criação das aves	Método de reposição da criação Acesso das aves fora do pátio Acesso das aves às áreas úmidas Confinar aves em algum momento Fonte de água das aves Presença de aves nos vizinhos Troca de aves ou ovos com outro produtor Visualização de aves silvestres na propriedade Prática caça Observação de aves doentes Observação de aves mortas

B) Análise molecular

Extração do RNA

Primeiramente, as amostras de suabe de traquéia e cloaca foram homogeneizadas e, após, clarificadas por centrifugação a 12.000 g por 5 min. (Spackamn & Suarez, 2008). O sobrenadante foi agrupado em *pools* por domicílio de até três amostras, respeitando o tipo de amostra (traquéia ou cloaca) e espécie da ave (galinha, marreco, pato, etc.) e 50 µL de cada *pool* foi utilizado para a extração. Para extração do RNA viral foi utilizado o MagMAX™-96 Viral RNA Isolation Kit (Life Technologies™, Grand Island, NY, EUA) de forma automatizada no aparelho MagMAX™ Express Magnetic Particle Processor (Life Technologies™, Grand Island, NY, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Com

este kit, o isolamento do RNA acontece através da lise viral em solução base de isotiocianato de guanidina e ligação do RNA em *beads* magnéticas, que o libera após algumas lavagens. O RNA foi eluído em 50 µL de tampão de eluição e armazenado a -80 °C.

RT-PCR em tempo real para Influenza aviária

A RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando o kit Taq Man[®] AIV-Matrix (Ambion, Austin, TX, EUA) que contém *primers* e sondas específicas para região do gene da matriz do vírus influenza A e para um controle interno de RNA (Xeno). Os *primers* para AIV têm como alvo um segmento do gene da matriz que é conservado entre todos os vírus influenza A e foram desenvolvidos segundo descrito por Spackman e colaboradores (2002). A reação de RT e a PCR foram realizadas em uma única etapa (*one-step*) e os níveis dos produtos de PCR foram monitorados com o aparelho e *software* 7500 System (Applied Biosystems, Forster City, CA, EUA). Segundo previamente descrito, a RT-PCR em tempo real realizada com os *primers* para este fragmento do gene tem uma sensibilidade de 93,8% e especificidade de 84% quando comparado com o isolamento viral (Spackman et al., 2002). O limite de detecção é de menos de 40 cópias de RNA alvo.

As reações de RT-PCR em tempo real tiveram um volume final de 25 µL e foram submetidas às seguintes condições: 45°C por 10 min. para a síntese do cDNA, 10 min. a 95°C seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 seg. e 60°C por 45 seg. Os dados de fluorescência foram adquiridos no final de cada etapa de anelamento. Para as amostras serem consideradas positivas os valores de *cycle threshold* (CT) deveriam ser ≤ 36 .

RT-PCR em tempo real para Doença de Newcastle

Para a amplificação das sequências virais do NDV por RT-PCR em tempo real foram utilizados *primers* e sonda previamente descritos por Wise e colaboradores (2004) que tem como alvo um segmento do gene da matriz do vírus. A reação foi realizada em uma única etapa (*one-step*) utilizando o Ag Path ID One step RT-PCR Kit (Ambion, Austin, TX, EUA) para TaqMan[®] RT-PCR em tempo real.

As reações de RT-PCR tinham um volume final de 25 μ L contendo 10 pmol de cada *primer*, 3 pmol da sonda, 12,5 μ L de tampão 2X RT-PCR (1,25 mM de Mg⁺ e 0,2 mM dNTPs), 1 μ L de 25X *mix* de enzimas e 8 μ L de RNA e foram submetidas a um programa de 50°C por 30 min. para a síntese de cDNA, 15 min. a 95°C e 40 ciclos de 94°C por 15 seg., 56°C por 20 seg. e 72°C por 40 seg. O termociclador 7500 (Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) foi utilizado e os dados de fluorescência foram adquiridos no final de cada etapa de extensão pelo *software* 7500 System. Para as amostras serem consideradas positivas os valores de CT deveriam ser ≤ 36 .

Como controle positivo da RT-PCR em tempo real foi utilizado um produto de PCR de uma amostra referência clonado. Este clone foi previamente produzido no Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves (CNPISA), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, Concórdia, SC). A especificidade do teste é 100% e a sensibilidade varia de 89,5 a 94,1% para amostras clínicas de suabe de traquéia e cloaca, respectivamente (Wise et al., 2004).

C) Análise sorológica

Detecção de anticorpos contra o vírus da influenza aviária

A análise sorológica para influenza aviária foi realizada através da detecção dos níveis de anticorpos IgG contra o vírus da influenza A no soro de todas as aves coletadas através de um kit comercial de ELISA de bloqueio seguindo o protocolo descrito pelo fabricante (IDEXX FlockChek™ Influenza A Ab Test Kit, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, EUA). Os ensaios foram conduzidos utilizando espectrofotômetro de microplacas (EX Read 400, Biochrom, Cambridge, Grã-Bretanha) na absorvância de 650 nm.

Os resultados foram determinados pelo cálculo da densidade óptica (DO) da amostra dividida pela média das DOs do controle negativo, o que resulta em um valor de amostra/negativo (S/N). Para espécies aviárias, quando o valor de S/N é inferior a 0,50, a amostra é considerada positiva para a presença de anticorpos contra Influenza A. Quando o valor de S/N é maior ou igual a 0,50, a amostra é considerada negativa. A sensibilidade do teste é de 95,4% e a especificidade de 99,7%, conforme informações disponíveis pelo fabricante. Este kit pode ser utilizado para avaliação de anticorpos em soro de qualquer espécie de ave, por isso todas as amostras foram analisadas.

Detecção de anticorpos contra o vírus da Doença de Newcastle

Para a detecção de anticorpos contra o NDV foi utilizado um kit de ELISA indireto comercial (IDEXX FlockChek™ NDV antibody test kit, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram conduzidos utilizando espectrofotômetro de microplaca (SpectraMax, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, EUA) na absorvância de 650 nm. A presença ou ausência de anticorpos no soro testado foi determinada pelo valor da razão amostra/positivo (S/P), relacionando-se o valor da DO da

amostra com a média dos controles positivos inclusos no kit. Nestes ensaios, a amostra é considerada positiva quando o valor de S/P é maior que 0,20. A sensibilidade do teste é de 100% e a especificidade de 89%. Os valores da média geométrica dos títulos (GMT) e o coeficiente de variação (CV) foram calculados com os títulos obtidos das aves de cada domicílio. Este kit é recomendado apenas para avaliação de anticorpos em soro de galinha doméstica e peru, por isso as demais espécies não foram analisadas.

Detecção de anticorpos contra Mycoplasma gallisepticum

A detecção de anticorpos contra MG foi realizada utilizando um kit comercial de ELISA indireto (FlockChek™ MG Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) seguindo as instruções do fabricante. As leituras da DO foram conduzidas em espectrofotômetro (SpectraMax, Molecular DevicesCo, Sunnyvale, CA, USA) em uma absorvância de 650 nm.

Amostras de soro são consideradas positivas quando a razão S/P (DO da amostra/média das DOs dos controles positivos) é maior que 0,5; e um domicílio foi considerado positivo quando pelo menos uma ave foi soropositiva. Os títulos de cada amostra foram calculados conforme orientações do fabricante, sendo considerada positiva a amostra com título maior que 1076. A sensibilidade e especificidade do kit são de 100% para amostras de galinha e peru. Para avaliar a distribuição dos títulos geral da população de aves amostradas em cada domicílio, foi calculada a GMT das amostras e CV. Este kit é recomendado apenas para avaliação de anticorpos em soro de galinha doméstica e peru, por isso as demais espécies não foram analisadas.

D) Análise estatística

Os dados dos questionários epidemiológicos foram armazenados em um banco de dados do *software Microsoft Access™* e, após, exportado para uma planilha *Microsoft Excel™* para análise descritiva e identificação dos fatores de risco. As variáveis foram ajustadas e expressas como contínuas ou categóricas.

O intervalo de confiança (IC) para a frequência de rebanho estimada para a população alvo foi calculado pelo método exato binomial no *software Epi Info™ 7* (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, Atlanta, GA, EUA). Foi utilizado o modelo de regressão de *Poisson* modificada (*Poisson with robust variance*) para verificar a hipótese de associação entre a variável resposta (número de aves positivas por domicílio) e as variáveis explanatórias (respostas do questionário) e, assim, determinar os possíveis fatores de risco associados com a positividade. Esta regressão de *Poisson* modificada foi selecionada, pois, segundo vários autores (Barros & Hirakata, 2003; Dohoo et al., 2003; Jackson et al., 2014), é um método utilizado com o intuito de evitar uma *over* dispersão na variância nos parâmetros estimados. As análises foram realizadas utilizando o procedimento GENMOD no *software SAS* versão 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). A variável *offset* utilizada foi o logaritmo do número de aves coletadas em cada propriedade, e a *robust variance* pôde ser estimada pela inclusão de medidas repetidas do assunto (*repeated subject*).

Inicialmente, as variáveis independentes foram testadas utilizando uma regressão univariada. Para inclusão no modelo multivariado foram selecionadas as variáveis com $p \leq 0,25$ (Teste Wald-tipo III) na regressão univariada. Todas as variáveis selecionadas foram checadas quanto à colinearidade e confundimento e ofertadas ao modelo multivariado de regressão de *Poisson*. Para análise de colinearidade entre as variáveis foram utilizados dois métodos de verificação: a correlação de Spearman ($> 0,70$) ou o valor de p ($p < 0,05$). No

caso de colinearidade, as variáveis eram escolhidas pela relevância biológica. Para a análise de confundimento foi observada a variação na magnitude no valor dos parâmetros estimados quando as variáveis eram testadas na regressão bivariada, sendo mantidas no modelo como um confundidor a variável que afetasse em mais de 30% a magnitude do valor de outras variáveis. Interações biologicamente plausíveis entre as variáveis adequadas ao modelo multivariado foram testadas e, se significativas ($p < 0,05$), foram submetidas à análise.

No modelo multivariado foi utilizado o método de seleção manual *backward*, onde as variáveis são eliminadas a cada passo pelo maior valor de p como critério de eliminação. A variável com maior valor de p era removida e o modelo reiniciado até que todas as variáveis sejam estatisticamente significativas ($p < 0,05$). O valor da razão de prevalência (PR) e o respectivo IC (95%) foram calculados pelo exponencial do resultado final dos parâmetros estimados pelo modelo para as variáveis significativas. O valor de PR foi selecionado para avaliação de fatores de risco por ser a representação preferível em estudos transversais (Dohoo et al., 2003). O melhor modelo de predição foi escolhido usando a informação de *Quaslikelihood under the Independence model Criterion* (QIC) e o valor de *deviance/degrees of freedom* (DF).

5.1.2. Resultados

A) Análise da população alvo

O inquérito foi realizado em 48 domicílios que criam aves de subsistência. Foram coletadas 411 aves, sendo que a grande maioria (95%) das amostras era de galinha doméstica (389 aves). As demais aves coletadas foram 17 marrecos ou patos (*Anas platyrhynchos domesticus* e *Cairina moschata domestica*), três gansos, um peru e uma galinha d'angola. As

aves coletadas não eram vacinadas contra nenhuma doença, não apresentavam sinais clínicos e eram, na grande maioria, adultas (acima de 3 meses).

Visualmente, as criações se caracterizavam pela ausência de medidas de biossegurança. Isto pode ser confirmado pela mistura de aves de diferentes espécies e idades, criação de aves soltas ou perto das lagoas, e pela presença de outros animais juntamente com a criação das aves (**Figura 7**).



Figura 7- Características das criações de aves de subsistência coletadas. Paineis A: mistura de aves de diferentes espécies e idades. Paineis B: presença de outros animais juntamente com a criação das aves. Paineis C: criação de aves soltas. Paineis D: criação de aves próximas de lagoas.

O questionário foi aplicado ao responsável do local em todos os domicílios. O número médio de aves por domicílio era de 30,6 aves (variando de 2 a 300), com mediana de 23 aves por domicílio, sendo que a maioria dos criadores (87,5%) possuía até 40 aves. As principais espécies de aves criadas nestas propriedades são da ordem dos galiformes (galinha, peru e galinha d'angola) e dos anseriformes da família dos anatídeos (pato, marreco, ganso), porém a grande maioria dos domicílios (70,8%) cria somente galiformes, principalmente a galinha doméstica. A criação de aves aquáticas (anatídeos) sempre acontece juntamente com a criação dos galiformes. Nos domicílios que criam estas espécies de aves, a média é de 14,2 anatídeos (variando de 3 a 50) e a mediana de 10 por domicílio.

Em relação à origem das aves, em 48% dos domicílios ela ocorre somente por reposição própria, e em 23% dos domicílios as aves são adquiridas somente através da compra em agropecuárias locais. A reposição própria e a compra em agropecuária ocorrem juntas em 29% dos domicílios. De acordo com informações das autoridades veterinárias locais, as aves adquiridas de agropecuárias são pintos não vacinados para NDV ou MG.

A compra das aves de vizinhos é menos comum e ocorre juntamente com outros métodos de reposição em 12,5% das propriedades, porém 45,8% dos criadores costumam trocar aves ou ovos com outro produtor. Além disso, mais da metade dos domicílios (62,5%) possuem vizinhos que também criam aves de subsistência, sendo que 31,3% dos criadores possuem vizinhos com aves e também praticam a troca de produtos.

As aves têm o hábito de circular fora do pátio em quase 48% dos domicílios amostrados, mas somente em cerca de 19% dos domicílios as aves têm acesso a banhados ou lagoas (que podem servir de local de alimentação para as aves migrantes). Em 43,8% das propriedades, os responsáveis afirmam já terem avistado aves silvestres no seu pátio (inclusive migratórias), mas apenas 4,2% admitiram que costumam caçar essas aves

silvestres. As principais espécies migratórias observadas são marrecos, maçaricos e garças. Dentre as espécies residentes avistadas, são relatadas principalmente quero-quero, joão-de-barro, gavião carcará, garça vaqueira e caturritas.

A fonte de água das aves é principalmente através de poço artesiano (87,5%), sendo que somente 10,4% dos criadores utilizam água de fonte natural para as aves. No momento da entrevista, 12,5% declaram que havia histórico de aves doentes nos últimos 30 dias, e 16,7% que havia ocorrido morte de aves também nos últimos 30 dias.

A criação de aves nos domicílios é geralmente associada a outros tipos de produções animais, principalmente de equinos (90%), ruminantes (75%) e suínos (52%). Somado a isto, há a criação de animais de companhia, como cães e/ou gatos, que ocorre em 94% dos domicílios.

Além destas informações, os criadores também foram questionados sobre seu conhecimento de influenza aviária, e 95,8% responderam que já ouviram falar na doença. Destes, as fontes de informação declaradas foram TV (84,8%), rádio (67,4%), inspetoria veterinária (34,8%), vizinhos (32,6%), palestras desenvolvidas na região (23,9%) e escola dos filhos (6,5%).

A localização geográfica das propriedades também foi registrada nas visitas às propriedades. Metade das propriedades se encontrava até 12 km do estuário da LP (foz da barra), onde a concentração de aves migratórias é significativamente maior que em outras áreas da região do PNL.

B) Influenza aviária

Todas as 411 amostras de aves foram analisadas na sorologia para influenza aviária. Destas, seis aves apresentaram anticorpos contra influenza A (1,5%) em duas propriedades

(4,2%; 95% IC: 0,5% – 14,3%) (**Figura 8**). Foram soropositivas, quatro galinhas domésticas e dois anatídeos (um pato e um marreco), sendo que uma propriedade apresentou uma galinha e um marreco positivos e a outra apresentou três galinhas e um pato positivos.

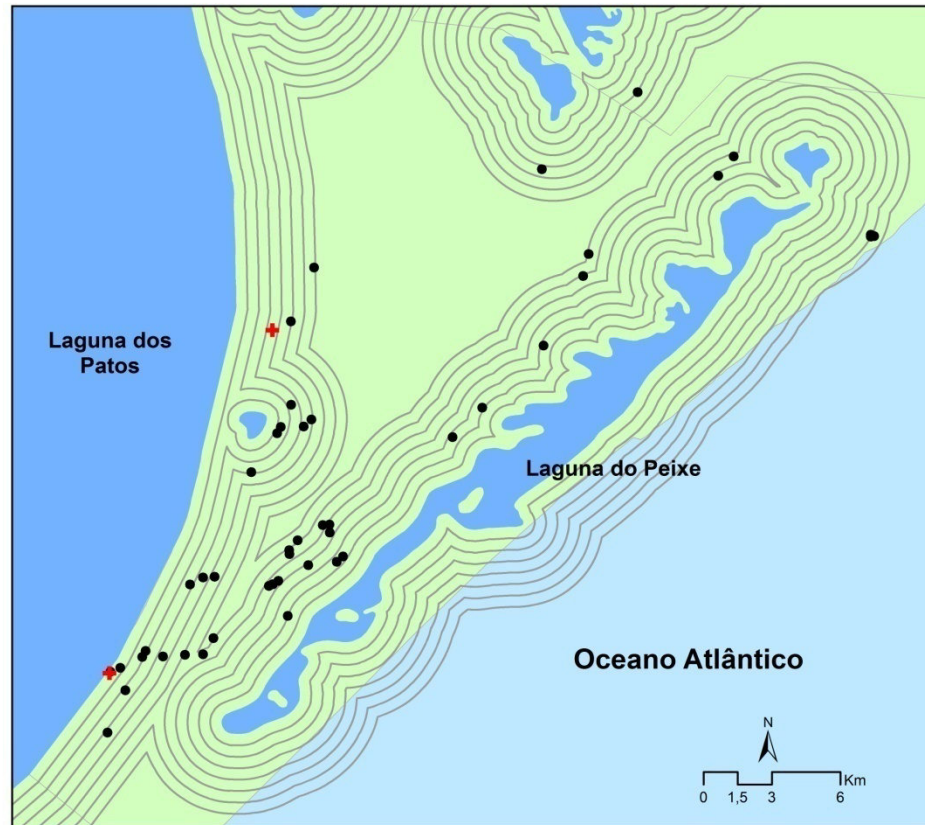


Figura 8- Distribuição espacial das propriedades soropositivas para AIV. As cruzes vermelhas indicam as propriedades positivas e os pontos pretos indicam as propriedades amostradas negativas.

Os valores de S/N das amostras positivas variaram de 0,122 a 0,481. A frequência intra-rebanho de aves soropositivas em cada propriedade foi de 22% (2/9) e 44% (4/9). A descrição das amostras soropositivas é apresentada na **Tabela 12**.

Tabela 12- Descrição das amostras soropositivas para Influenza A no ELISA.

Propriedade	Amostra	Espécie	Valor S/N
02	2D	Galinha doméstica	0,180
02	2F	Marreco	0,481
35	35F	Galinha doméstica	0,122
35	35G	Galinha doméstica	0,274
35	35H	Galinha doméstica	0,385
35	35I	Pato	0,173

Para RT-PCR em tempo real, as amostras de suabe de traquéia e cloaca foram agrupadas em 292 *pools* de acordo com o domicílio, tipo de suabe e espécie da ave. Todas as amostras foram negativas pelo RT-PCR em tempo real aplicado neste trabalho.

Não foi possível realizar uma análise de fatores de risco para presença de anticorpos contra influenza aviária pelo baixo valor de propriedades positivas (4,2%, propriedades 2 e 35). Assim, somente uma análise descritiva das características gerais de cada propriedade foi realizada. O número total de aves nas propriedades “2” e “35” era de 36 e 25 no momento da visita, respectivamente. A propriedade “2” está localizada na localidade de Capão Comprido e a “35” no Posto, ambas no município de Tavares. Nas duas propriedades havia a presença de suínos, equinos, cães e gatos, e somente na propriedade “35” eram criados ruminantes (sete bovinos). As duas propriedades fazem reposição própria e o proprietário da “2” também afirmou comprar aves das agropecuárias locais, mas nenhum dos produtores troca aves ou ovos com vizinhos. Apenas na propriedade “2” as aves têm acesso fora do pátio e a banhados, sendo que a fonte de água para as aves nas duas é através de poço artesiano. Os dois criadores responderam que já ouviram falar de influenza aviária, mas nenhum deles visualizou aves doentes ou mortas nos 30 dias anteriores à coleta de dados e amostras. Além disso, somente um declarou que avistava aves silvestres no seu pátio.

C) Doença de Newcastle

Na sorologia, das 390 amostras de soro analisadas, 132 aves (33,8%) apresentaram títulos considerados positivos para a presença de anticorpos contra NDV, e 42 domicílios (87,5%; 95% IC: 74,75% – 95,27%) apresentaram pelo menos uma ave positiva. Os títulos de anticorpos das aves variaram de valores negativos (títulos menores que 396) a valores superiores a 18.000. Considerando os domicílios positivos, o GMT variou entre 104,4 e 1.058, e o CV dos títulos teve alta dispersão (acima de 60%). A distribuição espacial das propriedades soropositivas é mostrada na **Figura 9**.

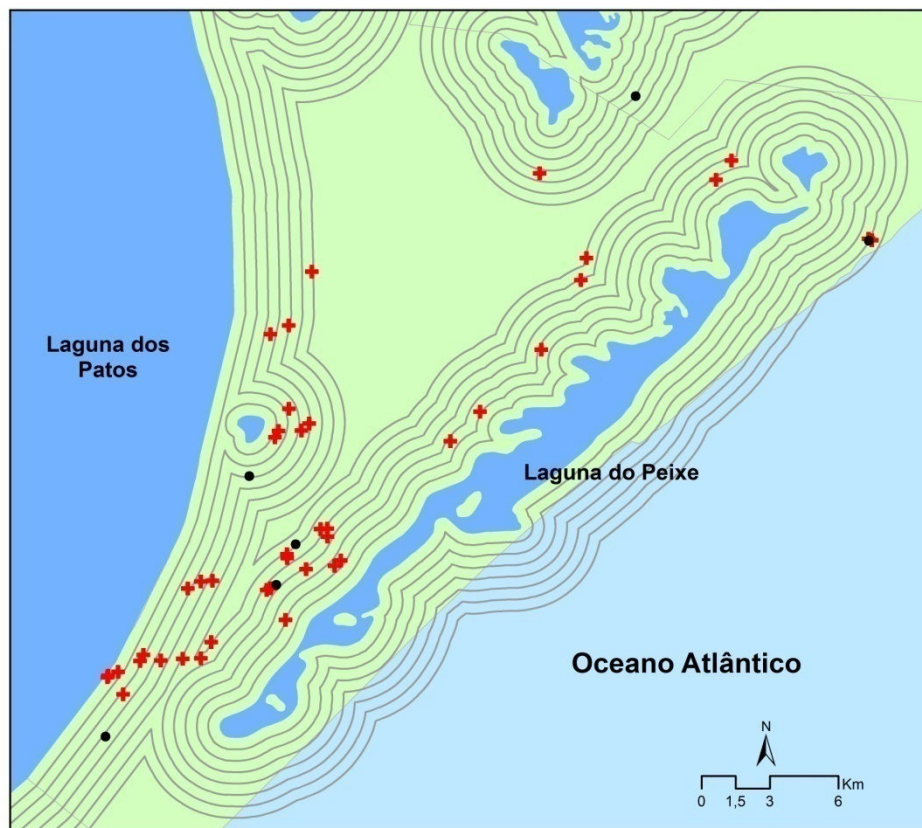


Figura 9- Distribuição espacial das propriedades soropositivas para NDV. As cruzes vermelhas indicam as propriedades positivas e os pontos pretos indicam as propriedades negativas.

Para RT-PCR em tempo real, as amostras de suabe de traquéia e cloaca foram agrupadas em 292 *pools* de acordo com o domicílio, tipo de suabe e espécie da ave. Todas as amostras foram negativas pelo RT-PCR em tempo real utilizado neste trabalho.

Para avaliação dos fatores de risco, 19 variáveis foram ofertadas na regressão de Poisson univariada (**Tabela 13**). Destas, sete foram selecionadas para a regressão multivariada, após análise de confundidores e colinearidade (**Tabela 13**). O resultado final da análise multivariada incluiu duas variáveis explanatórias (**Tabela 14**). O risco para a presença de aves soropositivas para NDV nas propriedades foi maior em estabelecimentos nos quais os criadores adotam a prática de reposição própria para manter a criação (PR=1,64; 95% IC: 1,11 – 2,42). Além disso, o aumento na distância das granjas em relação ao estuário da Laguna do Peixe diminui a PR (PR=0,94; 95% IC: 0,90 – 0,99).

Tabela 13- Resultados da regressão de *Poisson* univariada quanto à soropositividade para NDV das propriedades analisadas.

Variáveis	Categoria	N	PR	PR (95% IC)	p ^a
Distância do estuário da LP ^b	NA	48	0,95	0,91 – 1,00	0,09
Nº de aves/domicílio	NA	48	1,00	1,00 – 1,00	0,38
Nº de galiformes ^b	NA	48	1,00	1,00 – 1,00	0,24
Nº de habitantes	≥ 2	41	1,18	0,56 – 2,50	0,63
	< 2	7	*		
Presença de anatídeos	Sim	14	0,93	0,63 - 1,38	0,75
	Não	34	*		
Presença de cães	Sim	44	0,86	0,41 - 1,81	0,72
	Não	4	*		
Presença de gatos ^b	Sim	30	1,29	0,86 - 1,95	0,19
	Não	18	*		
Presença de suínos	Sim	25	1,25	0,86 – 1,83	0,22
	Não	23	*		
Presença de equinos	Sim	43	1,85	0,92 – 3,69	0,09
	Não	5	*		
Presença de ruminantes	Sim	36	1,73	1,06 – 2,84	0,02
	Não	12	*		
Faz reposição própria ^b	Sim	37	1,45	0,97 – 2,19	0,07
	Não	11	*		
Compra aves	Sim	24	0,87	0,60 - 1,24	0,44
	Não	24	*		
Aves têm acesso fora do pátio	Sim	23	0,97	0,67 - 1,38	0,87
	Não	25	*		
Aves têm acesso a banhados	Sim	9	0,92	0,57 - 1,51	0,76
	Não	39	*		
Vizinhos possuem aves ^b	Sim	30	0,72	0,50 - 1,03	0,07
	Não	15	*		
Troca aves ou ovos com outro produtor ^b	Sim	22	0,72	0,51 - 1,02	0,08
	Não	26	*		
Presença de aves silvestres no domicílio ^b	Sim	21	1,33	0,93 - 1,90	0,11
	Não	23	*		
Presença de aves doentes	Sim	6	1,14	0,81 - 1,60	0,47
	Não	42	*		
Presença de aves mortas	Sim	8	1,12	0,77 - 1,63	0,54
	Não	40	*		

PR=Razão de prevalência; NA=Variável contínua; ^aWald-tipo III; ^bVariáveis incluídas no modelo de regressão multivariado; *Categoria referência.

Tabela 14- Resultado final do modelo de regressão de *Poisson* multivariada para a presença de propriedades soropositivas para NDV¹

Variáveis	Categoria	PR	PR (95% IC)	p ^a
Faz reposição própria	Sim	1,64	1,10 – 2,42	0,02
	Não	*		
Distância do estuário da LP	Contínuo	0,94	0,90 – 0,99	0,04

¹Resultados do modelo: QIC=-11,73 e deviance/DF=1,29; ^aWald-tipo III; *Categoria referência.

D) Mycoplasma gallisepticum

Foram coletadas 411 aves de 48 propriedades que criam aves de subsistência, sendo que 390 amostras eram de galinhas domésticas e uma de peru. Destas, 391 amostras analisadas pelo ELISA, 14,3% (56 aves) foram soropositivas e 28 domicílios (58,3%; 95% IC: 43,2% – 72,4%) apresentaram pelo menos uma ave com resultado positivo para presença de anticorpos anti-MG. Todas as aves coletadas não eram vacinadas para MG ou qualquer outra espécie do gênero *Mycoplasma*.

Os títulos de anticorpos nas amostras individuais (aves) variaram de títulos considerados negativos (< 1.076) até valores acima de 15.000. Nos domicílios amostrados, as aves coletadas tiveram uma GMT que variou de 134,9 a 2630,5 ($\pm 59,2$), sendo a GMT mínima nas propriedades positivas de 216,8. O CV nas propriedades soropositivas foi altamente disperso, onde mais da metade (58,3%) tiveram um CV acima de 80%, indicando fortemente a presença da infecção no rebanho. A distribuição espacial dos domicílios soropositivos é demonstrada na **Figura 10**.

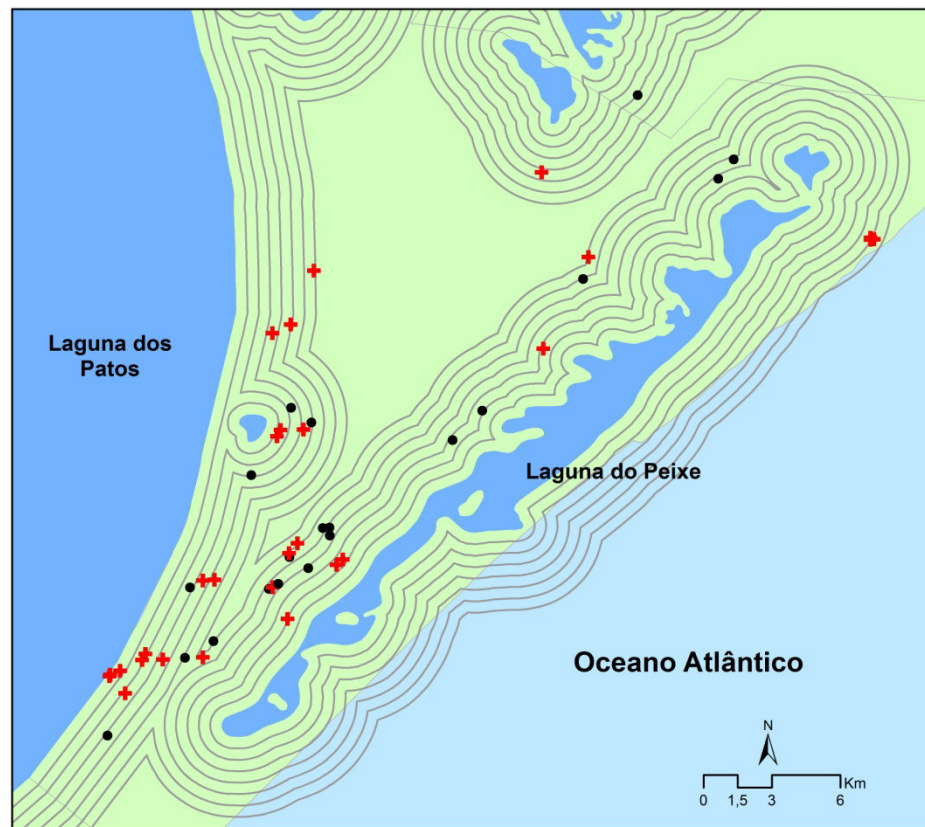


Figura 10- Distribuição espacial das propriedades soropositivas para MG. As cruzes vermelhas indicam as propriedades positivas e os pontos pretos indicam as propriedades negativas.

Na análise dos fatores de risco, 18 variáveis foram ofertadas na regressão univariada (**Tabela 15**). Destas, quatro foram significativamente associadas ($p \leq 0,25$) com a soropositividade das granjas para MG e incluídas no modelo multivariado. Ademais, cinco interações entre variáveis biologicamente plausíveis também foram testadas na regressão univariada (**Tabela 16**), sendo que apenas uma foi significativa ($p < 0,05$) e também incluída no modelo multivariado.

Tabela 15- Resultados da regressão de *Poisson* univariada quanto à soropositividade para MG das propriedades analisadas.

Variáveis	Categoria	N	PR	PR (95% IC)	p^a
Distância do estuário da LP	NA	48	1,02	0,95 – 1,10	0,60
Nº de aves/domicílio	NA	48	1,00	0,99 – 1,01	0,66
Nº de galiformes	NA	48	1,00	0,99 – 1,01	0,68
Nº de habitantes	≤ 2	41	0,66	0,29 – 1,50	0,41
	> 2	7	*		
Presença de anatídeos	Sim	14	1,11	0,55 – 2,27	0,77
	Não	34	*		
Presença de cães	Sim	44	1,65	0,53 – 5,20	0,35
	Não	4	*		
Presença de gatos	Sim	30	0,69	0,34 – 1,40	0,33
	Não	18	*		
Presença de suínos	Sim	25	1,10	0,54 – 2,22	0,80
	Não	23	*		
Presença de equinos	Sim	43	1,54	0,62 – 3,85	0,34
	Não	5	*		
Presença de ruminantes ^b	Sim	36	1,70	0,87 – 3,32	0,14
	Não	12	*		
Faz reposição própria	Sim	37	0,95	0,33 – 2,76	0,93
	Não	11	*		
Compra aves	Sim	24	1,29	0,64 – 2,61	0,49
	Não	24	*		
Confina as aves ^b	Sim	16	3,48	1,92 – 6,33	0,01
	Não	29	*		
Aves têm acesso fora do pátio	Sim	23	0,81	0,40 – 1,64	0,56
	Não	25	*		
Aves têm acesso a banhados	Sim	9	1,03	0,41 – 2,59	0,95
	Não	39	*		
Vizinhos possuem aves ^b	Sim	30	1,54	0,79 – 3,01	0,23
	Não	15	*		
Troca aves ou ovos com outro produtor ^b	Sim	22	2,11	1,10 – 4,03	0,06
	Não	26	*		
Presença de aves silvestres no domicílio	Sim	21	1,10	0,52 – 2,33	0,80
	Não	23	*		

PR=Razão de prevalência; NA=Variável contínua; ^aWald-tipo III; ^bVariáveis incluídas no modelo multivariado ($p \leq 0,25$); *Categoria referência.

Tabela 16- Resultados da regressão de *Poisson* univariada com as interações entre as variáveis quanto à soropositividade para MG das propriedades analisadas.

Variáveis	PR	PR (95% IC)	p^a
Presença de anatídeos x Presença de aves silvestres	0,45	0,20 – 1,02	0,06
Acesso fora do pátio x Acesso a banhados	0,58	0,25 – 1,39	0,22
Acesso fora do pátio x Vizinhos possuem aves	0,41	0,50 – 2,29	0,87
Troca ave/ovo com outro produtor x Vizinhos possuem aves ^b	2,48	1,27 – 4,83	0,01
Distância do estuário x Presença de aves silvestres	1,02	0,96 – 1,08	0,53

PR=Razão de prevalência; ^aWald-tipo III; ^bVariáveis incluídas no modelo multivariado ($p < 0,05$).

O modelo final da regressão de Poisson incluiu duas variáveis (**Tabela 17**). Foram considerados fatores positivamente associados com a presença de anticorpos anti-MG nas propriedades a prática de confinar as aves em algum momento do dia em galinheiros ou galpões (PR = 3,40, 95% IC: 1,93 – 5,99) e a interação entre a troca de aves ou ovos com outros produtores e o fato dos vizinhos também possuírem aves de subsistência (PR = 2,16, 95% IC: 1,24 – 3,76).

Tabela 17- Resultado final do modelo de regressão de *Poisson* multivariada para a presença de propriedades soropositivas para MG¹.

Variáveis	Categoria	PR	PR (95% IC)	p^a
Confina as aves	Sim	3,40	1,93 – 5,99	< 0,01
	Não	*		
Troca ave/ovos com outro produtor x Vizinhos possuem aves	Sim	2,16	1,24 – 3,76	0,03
	Não	*		

¹Valores do modelo: QIC=55,55 e deviance/DF=1,20; PR=Razão de prevalência; ^aWald-tipo III; *Categoria referência.

5.1.3. Discussão e conclusões

Este inquérito epidemiológico demonstrou a presença de doenças infecciosas respiratórias em propriedades que criam aves de subsistência na região do PNLP, RS. O local se caracteriza como um dos principais sítios de internada de aves migratórias (Resende e Leeuwenberg, 1987) e o tipo de criação amostrada apresenta características importantes que servem como potencial reservatório e sentinela para patógenos carregados por estas aves migratórias (Hernandez-Divers et al., 2006). Por isso, a região do PNLP se caracteriza como uma importante região de risco para introdução de patógenos carregados por aves migratórias em criações de aves domésticas, principalmente de subsistência (Corbellini et al., 2012).

Já foi demonstrado previamente que granjas de aves de subsistência possuem maior probabilidade de serem positivas para algumas doenças infecciosas do que granjas comerciais (Soos et al., 2008; Molia et al., 2011; Andriamanivo et al., 2012). Este fato é devido a algumas características destas granjas, como a ausência de biossegurança e contato com outras granjas e com aves silvestres (Akhtar & Zahid, 1995; East et al., 2006; Hernandez-Divers et al., 2006; Andriamanivo et al., 2012). Além disso, a movimentação de pessoas e animais também é importante para disseminação de patógenos e é facilitada pela ausência de biossegurança nas criações (Schelling, 1999; Kleven 2003; Hamilton-West, 2011). Ou seja, granjas com aves de subsistência servem como fonte de infecção tanto para aves comerciais como para espécies de aves silvestres que possam ter econtato (Hernandez-Divers et al., 2008).

Apesar da amostragem ser direcionada para a detecção de AIV, o estudo foi capaz de demonstrar a presença de anticorpos contra AIV, NDV e MG nas aves de subsistência, o que indica que há circulação destes patógenos neste ecótopo. Os resultados indicam que há que os patógenos circulam conjuntamente nas propriedades (**Apêndice D**), cabendo destacar que as

duas propriedades positivas para AIV foram também positivas para NDV e MG. Entre as positivas para MG (28/48), apenas duas não foram positivas para NDV. Não houve a detecção de AIV e NDV pelo teste de RT-PCR em tempo real. Apesar disso, a detecção de anticorpos é uma forma efetiva de se avaliar o espalhamento e a presença de doenças infecciosas em um grupo de aves não vacinadas em uma determinada região (McMartin et al. 1987; Soos et al., 2008). Os resultados positivos na sorologia para AIV, NDV e MG nas propriedades amostradas neste estudo demonstram que as aves de subsistência coletadas aleatoriamente foram previamente expostas ao agente e que os patógenos estão presentes nas aves da região, apesar das aves não estarem eliminando-os no momento da coleta. Além disso, cabe ressaltar que a presença de patógenos de baixa patogenicidade circulantes pode induzir a soroconversão sem achados clínicos com rápida e/ou baixa excreção viral, o que possivelmente reflete a situação ecológica do PNLP. Este fato condiz com resultados prévios de isolamento de cepas de AIV e NDV de baixa patogenicidade em aves migratórias da região do PNLP (Araújo et al., 2004; Orsi, 2010).

Viroses e doenças bacterianas são as causas de quase 90% das mortalidades de aves de subsistência (Metz et al., 2013). Várias doenças já foram diagnosticadas neste tipo de criação, incluindo AIV, NDV e MG (Kelly et al., 1994; Schelling et al., 1999; Hernandez-Divers et al., 2006; Terregino et al., 2007; Hernandez-Divers et al., 2008; Biswas et al., 2009; Zheng et al., 2010; Biswas et al., 2011; Xavier et al., 2011; Chaka et al., 2013; Madsen et al., 2013).

Não há evidências de AIV em granjas comerciais no Brasil, porém, cepas de baixa patogenicidade (H3) já foram isoladas de galinhas domésticas e aves silvestres da ordem Charadriiformes na região norte e nordeste do país (Senne, 2010). Nas aves silvestres do PNLP já foi relatado o isolamento viral dos subtipos H2 e H4, inclusive de espécies migrantes do Hemisfério Norte (Araújo et al., 2004). Outro estudo demonstrou que pássaros migrantes e

residentes de São Paulo são transportadores do vírus influenza (Kawamoto et al., 2005; Soares et al., 2005). Além disso, foi verificada a presença de anticorpos contra os subtipos H5, H7 e H9 em aves silvestres no estado de São Paulo (Sousa et al., 2013). Apesar de existirem cepas dos subtipos H5 e H7 de baixa patogenicidade, até o momento, somente estes subtipos têm o potencial para mutar e se tornar cepas de alta patogenicidade em espécies suscetíveis (Alexander et al., 2007), e por isso fazem parte da lista de doenças da OIE e devem ser notificados em caso de surto. Já o subtipo H9 possui um grande potencial pandêmico (Matrosovich et al., 2001; Wright et al., 2007).

Nossos resultados demonstraram que duas propriedades (4,2%) apresentaram aves soropositivas para AIV. Este resultado indica a circulação de AIV em aves de subsistência da região. Como a amostra foi delineada para detectar a presença do agente (em uma prevalência de 5%), a detecção de propriedades positivas indica uma prevalência de AIV na região maior que 5% (valor considerado inicialmente para o cálculo amostral). Neste contexto, caso não tivessem sido detectadas propriedades positivas, isto indicaria que a prevalência seria menor que 5%, e poderia-se considerar a região livre de AIV.

A identificação dos subtipos de AIV nas amostras soropositivas não foi possível, pois, no Brasil, esta só pode ser realizada em um laboratório de biossegurança nível 3 (NB3) que possua amostras referência viáveis de AIV de diferentes subtipos. Alternativamente, isto pode ser realizado através de solicitação ao MAPA para tipificação em seu laboratório oficial. Neste trabalho, a solicitação ao MAPA não foi atendida devido à ausência de um termo de colheita oficial, mesmo após requerimento do mesmo às autoridades competentes. A subtipificação tem importância para identificação da provável origem do vírus. Mesmo sem a subtipificação de AIV, estes resultados não descartam a hipótese de transmissão do vírus de aves silvestres presentes na região para as aves de subsistência, visto que os subtipos H2 e H4

já foram detectados na região (Araújo et al., 2004). Na região de estudo há uma grande quantidade de aves aquáticas residentes ou migratórias das ordens Anseriformes e Charadriiformes, principais reservatórios do AIV (Webster et al., 1992; Clark & Hall, 2006; Stallknecht & Brown, 2009). Além disso, há relatos de casos de AIV, incluindo subtipos de alta patogenicidade, nas espécies que migram para a LP (Alexander, 2000; Hanson et al., 2008; Feare, 2010; Reperant et al., 2011).

Apesar de não ser possível a análise de fatores de risco para AIV, algumas características e práticas dos criadores das propriedades soropositivas podem indicar alguma relação com o observado em outros estudos onde há a presença de AIV. As duas propriedades positivas continham anatídeos nas suas criações. Como já mencionado, as aves aquáticas são considerados reservatórios de AIV e podem entrar mais facilmente em contato com aves migratórias por ocuparem locais em comum. A criação de anatídeos juntamente ou próximos às aves domésticas acabam por aumentar o risco da presença de AIV (Hulse-Post et al., 2005; Gilbert et al., 2006; Terregino et al., 2007; Ward et al., 2009). O contato de galinhas com criações de aves aquáticas dos vizinhos é um fator de risco para transmissão de doenças infecciosas, como AIV, em aves de subsistência na China (Wang et al., 2013). Além disso, há relatos que criações de aves de subsistência expostas à presença de aves aquáticas tiveram maior risco de ser soropositivas para AIV do que as não expostas nos EUA (Madsen et al., 2013), e a separação dos anatídeos das galinhas durante a noite dentro de uma mesma granja serviria como um fator protetivo para presença de AIV (Biswas et al., 2009).

A criação de outros animais também ocorre nas propriedades soropositivas para influenza A. Alguns subtipos deste vírus podem infectar, por exemplo, tanto aves como suínos ou equinos (Webster et al., 1992). A presença de AIV em granjas de aves já foi associada com a proximidade destas com criações de suínos (Corzo et al., 2012), e

transmissão de AIV entre estas duas espécies já foi documentada (Andral et al., 1985; Choi et al., 2004).

A compra de aves em agropecuárias pode influenciar na presença de AIV nas granjas de aves subsistência em algumas regiões onde o vírus esta presente de forma endêmica ou em surtos (Biswas et al., 2009; Biswas et al., 2011; Wang et al., 2013). Porém, não há evidencia da presença de AIV em granjas comerciais do RS, possíveis fornecedoras de aves para as agropecuárias da região. Por isso, a reposição própria que acontece nas duas propriedades poderia ajudar na introdução constante de aves suscetíveis, favorecendo a persistência da infecção na população (Hernandez-Divers et al., 2006). A troca de aves entre vizinhos também poderia aumentar o risco de AIV (Paul et al., 2011; Wang et al., 2013). Porém, esta não é uma prática que acontece nas propriedades soropositivas.

Outro ponto importante é a possibilidade de acesso destas aves de subsistência a áreas de banhado/úmidas, que acontece em uma das propriedades. O acesso das aves a uma fonte de água, como lagoas, lagos, banhados, próxima a granjas de subsistência é um fator de risco para AIV (Biswas et al., 2009; Desvaux et al., 2011). Isto acontece pelo compartilhamento destas áreas alagadas por aves domésticas e aves silvestres (Biswas et al., 2009) e pelo possível papel desempenhado pela água na transmissão do vírus ou como um reservatório temporário (Brown et al., 2007; Desvaux et al., 2011).

A presença de aves silvestres foi relatada em apenas uma propriedade. Porém, este fator parece ser o mais determinante para a introdução e manutenção do AIV em granjas de subsistência (Tracey et al., 2004; Terregino et al., 2007; Biswas et al., 2009; Feare, 2010; Biswas et al., 2011; Keawcharoen et al., 2011; Wang et al., 2013; Sheta et al., 2014). Além de a região servir como sítio de invernada para aves migratórias, a disponibilidade de alimentos

também poderia atrair aves silvestres às propriedades com aves de subsistência, resultando no contato direto ou indireto (com as fezes) entre as aves (Terregino et al., 2007).

A transmissão de AIV para aves domésticas através do contato com aves migratórias é conhecida e comprovada, e pelo fato do estudo estar concentrado em um sítio de migração (PNLP) acreditava-se que as aves migratórias também poderiam ser uma fonte de infecção para as aves de subsistência na região. Apesar de serem detectados anticorpos contra AIV nas aves de subsistência, não foi possível comprovar esta hipótese.

Além de AIV, 87,5% dos domicílios apresentaram pelo menos uma ave positiva para a presença de anticorpos contra NDV. A prática de reposição própria do rebanho foi uma variável considerada fator de risco para soropositividade de NDV; ao passo que, o aumento na distância das propriedades ao estuário da LP diminui o risco.

Apesar de vários trabalhos no mundo mostrarem a soroprevalência de NDV em criações de aves de subsistência, há poucas informações sobre os fatores de risco associados à presença do NDV nestas granjas. Em granjas comerciais, os principais fatores de risco encontrados foram à proximidade com outras granjas, contato com aves silvestres, aumento na idade das aves, ausência de biossegurança (incluindo manejo inadequado na limpeza, no armazenamento da ração e no controle da movimentação de pessoas e aves), e pouca experiência na produção de aves (East et al., 2006; Akhtar et al., 1995; Andriamanivo et al., 2012).

Em estudos realizados com aves de subsistência, a soroprevalência de NDV foi associada com a espécie de ave (maior em galinhas que patos) e idade (maior em adultos que jovens) (Molia et al., 2011). Em criações de aves de subsistência na Suíça, os rebanhos de galinhas, patos ou gansos de raça pura foram mais propensos a conter pelo menos uma ave soropositiva para NDV do que granjas com aves mestiças (Schelling et al., 1999). Na Etiópia,

o risco para a exposição de NDV foi aumentado em granjas de subsistência de grande porte, nas quais havia uma frequência reduzida na limpeza de resíduos e a compra era realizada para reposição do rebanho (Chaka et al., 2013).

O fato da reposição própria dentro da granja estar associada à presença de NDV pode estar relacionado com a perpetuação/manutenção de aves e progênes infectadas dentro do domicílio (Awan et al. 1994). Ou seja, a progênie de reposição própria tem grandes chances de infectar-se logo após o nascimento através do contato direto com os indivíduos previamente expostos. Além disso, a reposição própria torna impraticável o *all in all out*, já que novas aves são constantemente adicionadas sem medidas preventivas a um ambiente em que o vírus está circulando. Uma vez que o vírus tenha entrado no rebanho, é razoável hipotetizar que a reposição própria seja possivelmente um dos mais importantes aspectos que podem influenciar a permanência do vírus.

Em um estudo epidemiológico realizado na Etiópia, foi demonstrado que o uso de reposição própria como a única estratégia era um fator protetivo em relação a outras práticas de reposição, tais como a compra do mercado local (Chaka et al., 2013). É importante notar que em explorações negativas para a presença de NDV, esta estratégia pode evitar a infecção, no entanto, uma vez que o vírus já tenha sido introduzido na granja, a reposição própria tende a favorecer a persistência do vírus. No caso dos rebanhos de subsistência da Etiópia, a reposição com aves do próprio rebanho pode ter sido protetivo, pois, nesta área, os agricultores compram aves nos mercados de aves vivas, onde as galinhas não-vacinadas são soropositivas e reconhecidamente potenciais fontes de infecção de NDV e diversas outras enfermidades (Chaka et al. , 2012). Este é um exemplo das diferenças observadas entre diferentes regiões sobre fatores de risco e epidemiologia do vírus, que indica a importância de estudos epidemiológicos para cada região.

Neste estudo mostrou-se que a PR de NDV é associada negativamente com o aumento da distância das propriedades com estuário da LP, ou seja, o aumento na distância das propriedades em relação ao estuário diminui o risco de NDV. Na época em que o a LP está ligada ao mar, a região do estuário é o local com a maior concentração e diversidade de espécies de aves (tanto de aves migratórias como de residentes), devido às suas características ambientais, como a disponibilidade de alimentos, a sua fauna e flora singulares, e abundância de locais de repouso em águas rasas (Resende e Leeuwenberg, 1987; Knak, 1999; Gonçalves, 2009). Assim, a proximidade com o estuário favorece o acesso das aves silvestres nas propriedades e seu contato com as aves de subsistência. Em um trabalho realizado na China, o contato com aves silvestres foi associado com um risco aumentado para doenças infecciosas em aves de subsistência (Wang et al. , 2013). Além disso, aves de subsistência infectadas também poderiam atuar como potenciais disseminadores da infecção para as aves silvestres migratórias, que podem espalhar o vírus para outras regiões (Hernandez-Divers et al., 2008).

Quanto à presença de MG, 58,3% das propriedades possuíam pelo menos uma ave soropositiva, e 14,3% das aves testadas eram soropositivas para MG. A frequência de anticorpos contra MG pode variar de acordo com a região geográfica e o desenho amostral. São poucos os estudos que avaliam a soropositividade de MG em criações de aves de subsistências no Brasil e no mundo, e geralmente não apresentam uma amostragem probabilística. No Brasil, um estudo realizado em criatórios de galinhas de “fundo de quintal” próximos a matrizeiros em São Paulo mostrou que 73% dos criatórios e 30,3% das aves eram soropositivas para MG (Buchala et al., 2006). Ainda na América do Sul, uma soroprevalência animal de 26% e 73% foi encontrada em aves de subsistência no Paraguai e Equador, respectivamente (Herrero et al., 2009; Hernandez-Divers et al. 2006). Na província de Entre Rios na Argentina a soroprevalência nos criatórios variou de 33 a 76% nos diferentes anos de

coleta (Xavier et al. 2010). Demais estudos disponíveis demonstram uma frequência de detecção de anticorpo contra MG em aves de subsistência que varia entre 25,7% a 78,7% (McBride et al., 1991; Kelly et al., 1994; Thekisoie et al., 2003; Chaka et al., 2012).

É clara a importância de estudos sobre a circulação ou detecção de anticorpos contra MG em aves de subsistência, já que é demonstrado o papel destas aves como potenciais reservatórios e disseminadores de MG para aves silvestres e outras aves domésticas (Hernandez-Divers et al., 2008; Kelly et al., 1994). Porém, o conhecimento sobre os fatores de risco associados com a presença desta bactéria nas aves de subsistência também é essencial para melhoria nas estratégias de controle e prevenção da doença. Em relação à presença de MG, não há nenhum trabalho na literatura que investigue possíveis fatores de risco associados em aves domésticas de subsistência ou comerciais. Nas criações de aves de subsistência estudadas, a probabilidade de encontrar anticorpos contra MG é aumentada quando há o confinamento das aves e na interação entre as variáveis “troca de aves e ovos com outros produtores” e “vizinhos também possuem aves de subsistência”.

O confinamento das aves pode estar associado com a elevada infecciosidade de MG entre aves suscetíveis (McMartin et al., 1987) e a via de transmissão. Considerando que as principais vias de infecção de MG são através do trato respiratório e da conjuntiva, um contato mais intenso é necessário para transmissão (Kleven, 2003). Além disso, é importante notar que a transmissão bacteriana por aerossóis é favorecida entre aves em ambientes com alta densidade animal, onde a circulação de ar é restrita (Kleven, 2003), tal como em galinheiros. Ademais, este processo de criação pode permitir a contaminação de alimentos, água e ambiente compartilhado por aves confinadas. Já foi demonstrado que a infecção de MG em passeriformes parece se espalhar mais rapidamente quando as aves ficam em bandos agregados, pela transmissão direta pelo contato e indiretamente pela contaminação de

alimentos (Faustino et al., 2004). Em galinhas domésticas, foi relatado que a densidade populacional aumenta a taxa de espalhamento de MG (McMartin et al., 1987), possivelmente pelo aumento do número de contatos entre aves infectadas e suscetíveis.

A interação entre “troca de aves e ovos com outros produtores” e “vizinhos possuem aves” também foi considerada um fator de risco. A troca de aves com outros produtores pode levar à introdução tanto de aves suscetíveis como de aves infectadas. Este fator de risco é importante, tendo em conta a elevada infecciosidade observada para MG, dado que uma vez que este microorganismo é introduzido numa população suscetível a maioria das aves tende a se infectar (McMartin et al., 1987). Além disso, a introdução de aves suscetíveis pode favorecer a persistência da infecção numa população (Hernandez-Divers et al., 2006), e pela ausência de monitoria e vigilância do MG nas aves de subsistência, a doença pode se manter endêmica na população também através da transmissão da bactéria pelo ovo (Hernandez-Divers et al., 2006).

Além disso, aparentemente, o fato de vizinhos também possuem aves pode aumentar a possibilidade de troca de aves ou ovos com outros produtores vizinhos. Na região estudada, a troca de aves e ovos ocorre principalmente com os vizinhos ou parentes durante as visitas às propriedades (dados não mostrados). Devido a isto, o aumento do risco associado com a troca de aves e ovos com outro produtor pode estar relacionado também ao movimento de pessoas entre as fazendas e a transmissão da bactéria por fômites (Kleven, 2003). A proximidade e o trânsito de pessoas entre propriedades foram sugeridos como um fator determinante para a presença MG em granjas comerciais e de subsistência nos EUA (McBride et al., 1991).

Os resultados suportam a hipótese de que há circulação de patógenos associados a aves migratórias (AIV, NDV e MG) na região do PNL. Apesar de não ser possível a confirmação da hipótese do contato das aves de subsistência com aves migratórias como fator

de risco para presença dos patógenos pesquisados, não se pode descartá-la completamente. Cabe ressaltar que a identificação do aumento na distância das granjas em relação ao estuário da Laguna do Peixe como uma variável que diminui a PR para NDV reforça a problemática do papel das aves migratórias na disseminação dos patógenos estudados na região. Ademais, os resultados revelam a importância das criações de aves de subsistência da região do PNLN como potenciais reservatórios e fonte de infecção de doenças que podem afetar tanto aves domésticas comerciais como aves silvestres migratórias que chegam ao local. O fato de existirem propriedades soropositivas para AIV, NDV e MG indica que estes patógenos estão circulando em criações de aves de subsistência, ao menos na população próxima a sítios de aves silvestres. Os dados sobre fatores de risco associados à presença de NDV e MG aprimoram os conhecimentos sobre a dinâmica das doenças em criações de aves de subsistência e reforçam que características comuns destas criações, como práticas de biossegurança insuficiente e manejo inadequado, devem ser revisadas e monitoradas para o controle da introdução e do espalhamento de doenças no Brasil.

Considerando que aves de subsistência são mais propensas a entrarem em contato com aves migratórias e silvestres, devido à falta de medidas de biossegurança, elas podem servir como sentinelas para a introdução e disseminação de patógenos dentro de uma região e para granjas de aves comerciais (Hernandez- Divers et al., 2008; Wang et al., 2013). Os resultados deste inquérito validam a hipótese da utilização de aves de subsistência em áreas úmidas e de migração como sentinelas das doenças de aves em uma região e podem servir de base para programas oficiais de vigilância no Brasil.

5.2. Capítulo II – Modelagem de espalhamento de HPAIV

Neste capítulo, descreve-se o modelo matemático de simulação realizado para avaliar o espalhamento do vírus da influenza aviária de alta patogenicidade (HPAIV) em criações de aves de subsistência localizadas na região do Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP), RS.

5.2.1. Metodologia

A) Área de estudo e população alvo

A população alvo selecionada para simulação de espalhamento foram as 447 propriedades onde há criação de aves de subsistência localizadas na região do PNL. Uma lista contendo o nome dos moradores, juntamente com a coordenada geográfica, número de aves criadas e a presença ou não de anatídeos em cada domicílio foi utilizada. A distribuição geográfica das propriedades pode ser visualizada na **Figura 11**.

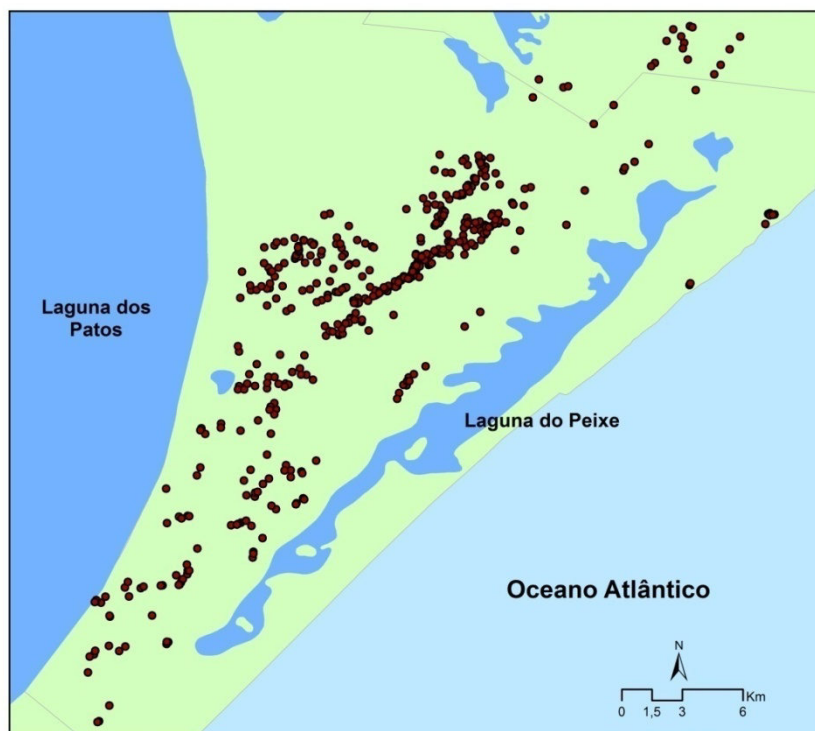


Figura 11- Distribuição geográfica das 447 propriedades que criam aves de subsistência na região de estudo.

B) Modelo

A modelagem de espalhamento de H5N1 na região do PNPL foi realizada através de um modelo estocástico SIR (Suscetíveis – Infectados – Recuperados). Nele, considera-se que uma propriedade infectada pode infectar uma propriedade suscetível através de um contato direto ou indireto, sendo que cada tipo de contato possui sua respectiva probabilidade de transmissão do vírus. E, uma vez que uma propriedade se torna infectada, esta permanece neste estado por um período, no qual pode transmitir o vírus para outras propriedades suscetíveis com a qual tenha contato e, finalizado o período em que a propriedade está infectada, esta passa para o estado recuperado, representando um período em que a propriedade não pode adquirir o vírus, seja por não ter mais aves, ou por estas se tornarem imunes. Este modelo de espalhamento foi aplicado em redes complexas não-direcionadas através de algoritmos, previamente desenvolvidos por Ossada e colaboradores (2013) e Grisi-Filho e colaboradores (2013a), utilizando o *software* R (<http://www.r-project.org/>) e o pacote *igraph* (desenvolvido para análise de rede e visualização).

Neste estudo, modelaram-se as relações entre as propriedades utilizando uma estrutura de rede. Assim, as propriedades são representadas por vértices (ou nós) e os contatos (diretos ou indiretos) realizados entre as propriedades são representados por arestas não-direcionadas (por exemplo, se aves da propriedade A entram em contato com ave da propriedade B, conseqüentemente, as aves da propriedade B também entraram em contato as aves da propriedade A, caracterizando uma relação bilateral). Os vértices e as arestas formam as redes, as quais são representadas por matrizes de adjacência, que demonstram quais vértices entraram em contato (direto ou indireto) com outros vértices, e portanto podem ser considerados adjacentes. Na matriz de adjacência, os valores a_{ij} iguais a 1 indicam a ocorrência de um contato (direto ou indireto) entre um vértice i e um vértice j , e valores iguais

a 0 indicam a ausência deste contato. Na **Figura 12** está um exemplo de uma rede não-direcionada e sua respectiva matriz de adjacência.

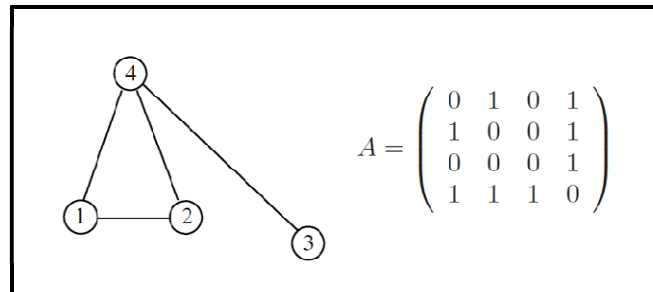


Figura 12- Exemplo de uma rede não-direcionada e sua respectiva matriz de adjacência. Fonte: Caldarelli (2007).

Além disso, uma importante medida de rede é o grau (k) de um vértice, que é definido como o número de arestas que este possui, sendo que no caso de uma rede em que as arestas são não-direcionadas, o grau k de um vértice i pode ser calculado somando-se a linha ou a coluna i da matriz de adjacência e é definido, segundo Caldarelli (2007), como:

$$K_i = \sum_{j=1, n} a_{ji}$$

Uma vez que se tenha obtido o grau dos vértices, é possível obter o grau médio da rede, que pode ser definido como a média dos graus dos vértices da rede. A escolha dos vértices ao qual o vértice i irá se conectar é realizada de forma estocástica entre aqueles nos quais os valores a_{in} forem iguais a 1 nas matrizes de adjacência de contato direto ou indireto, através de uma probabilidade de um vértice (n) se conectar ao vértice i (modificado de Ossada, 2010).

Para a rede de contatos entre as propriedades com aves de subsistência na região do PNLP foram utilizadas 2 matrizes de adjacência, uma de contato direto entre os domicílios e

outra de contato indireto, construídas a partir do cálculo das distâncias entre as propriedades e dos parâmetros de entrada: distância de contato direto e indireto, respectivamente.

C) Parâmetros de entrada

A fim de obter dados para parâmetros de entrada do modelo, dois questionários epidemiológicos foram realizados nas propriedades da região do PNLN que criam aves de subsistência. O primeiro questionário (q1) foi aplicado pelo serviço veterinário oficial (SVO) em 183 propriedades que criavam aves de subsistência. No q1 os criadores foram questionados sobre presença e número de espécies animais, aspectos sócio-econômico e práticas de criação (mais detalhes em Corbellini et al, 2012). O segundo questionário (q2) foi aplicado em 56 propriedades com o intuito de colher informações detalhadas sobre o deslocamento de pessoas e produtos (especialmente aves) entre as propriedades na região.

Os parâmetros de entrada utilizados foram: R_0 , distância de contato direto, distância de contato indireto, tempo de duração da infecção em cada propriedade, e probabilidade de transmissão do vírus através do contato direto e indireto. Os valores de R_0 (taxa reprodutiva básica), ou seja, o número esperado de casos secundários produzidos por um caso primário em uma população suscetível, utilizado foi obtido através de dados de surtos de HPAIV ocorridos em outros países (Ward et al., 2008; Garske et al., 2007). A distância de contato direto representa a distância (a partir de dados obtidos nos questionários epidemiológicos) entre dois domicílios, nos quais o contato direto entre aves de rebanhos vizinhos foi relatado pelo proprietário. A distância de contato indireto, por sua vez, é a distância (a partir de dados obtidos nos questionários epidemiológicos) entre dois domicílios em que há contato através de troca/comércio de aves ou movimentação de pessoas e fômites de acordo com o relato dos entrevistados. O tempo de duração da infecção em cada propriedade (ou seja, o tempo que um

domicílio mantém-se classificado como infectado no modelo, pois após este período será classificado como recuperado, não retornando a ser suscetível) foi determinado a partir dos dados de 0,24 dias de período de latência; 2,1 dias de período infeccioso e uma taxa de transmissão β de 0,76 (Bouma et al., 2009), utilizando-se um modelo SLIR (MATLAB versão 6, Mathworks Inc., Natick, MA, EUA) (Amaku, comunicação pessoal). As probabilidades de transmissão do vírus através do contato direto ou indireto indicam a chance dos casos secundários terem sido infectados através de contato direto ou indireto.

D) Simulações e parâmetros de saída

Para as simulações, foram considerados os domicílios suscetíveis com pelo menos um anatídeo (patos, marrecos, gansos) na propriedade como pontos de entrada do vírus na região do PNLP. Este critério foi determinado pelo fato destas aves representarem biologicamente um maior risco por serem os reservatórios naturais do vírus, ou seja, anatídeos tendem a ser mais suscetíveis, contudo apresentando infecções subclínicas (Kim et al., 2009). Além disso, os resultados obtidos em nosso inquérito epidemiológico (Capítulo I da tese), nas quais as duas propriedades positivas para AIV apresentavam anatídeos soropositivos, reforçam a hipótese que propriedades onde há anatídeos na criação teriam uma maior probabilidade de se infectar e disseminar o vírus para outras propriedades (Gilbert et al., 2006). Assim, foram determinados 92 domicílios como possíveis pontos de entrada do vírus.

Uma vez determinados os vértices (propriedades) que iniciariam as simulações infectados, realizou-se 10 iterações para cada possível ponto de entrada, totalizando 920 simulações. Cada uma das iterações resulta em resultados (epidemias) distintos, de acordo com as redes e probabilidades fornecidas pelo modelo. Os resultados (parâmetros de saída) obtidos foram a média e mediana do total e da proporção de rebanhos suscetíveis (S),

infectados (I) e recuperados (R) em cada dia da simulação da epidemia durante um intervalo simulado de 90 dias.

E) Análise de cenários e sensibilidade

Neste tipo de análise são avaliados diferentes cenários de incertezas nos parâmetros de entrada, a partir de variações dos valores utilizados para construção de um cenário de referência. O cenário de referência é aquele na qual são utilizados os dados dos parâmetros de entrada R_0 , distância de contato direto e distância de contato indireto considerados mais compatíveis com a situação estudada. Neste caso, foram considerado para o cenário de referência o único valor de R_0 para H5N1 entre rebanhos em aves de subsistência disponível na literatura (Ward et al., 2008) e os valores de distância média de contato (direto ou indireto) obtidos nos questionários epidemiológicos.

Os cenários de incerteza (variações nos parâmetros de entrada) foram definidos a fim de se avaliar a sensibilidade destas variações no parâmetro de saída média do número de propriedades infectadas no dia 30. Nestes cenários foram considerados os valores mínimos e máximos de R_0 obtidos por Garske e colaboradores (2007) para HPAIV em aves de subsistência. Para distância de contato (direto ou indireto) foram utilizados os valores mínimos e máximos obtidos nos questionários epidemiológicos. Além disso, para permitir a comparação do efeito da variação de cada parâmetro de entrada no parâmetro de saída (média do número de propriedades infectadas no dia 30), também foram considerados nestes cenários variações arbitrárias de 20% (para mais ou para menos) nos valores do cenário de referência. Todos os cenários de incerteza foram avaliados considerando-se apenas a variação de um parâmetro de entrada por vez.

A sensibilidade foi verificada pela alteração do parâmetro de saída, sendo possível calcular a porcentagem de mudança deste parâmetro e o logaritmo do risco relativo (logRR) de casos para cada valor alterado. Além disso, o coeficiente de determinação (R^2) foi calculado através de regressão linear a fim de servir de indicativo para o quanto cada parâmetro de entrada conseguiria explicar o valor do parâmetro de saída.

5.2.2. Resultados

A) Análise descritiva

No q1, 183 domicílios que possuíam aves de fundo de quintal foram questionados quanto às práticas utilizadas na criação das aves. A média de aves criada foi de 22,7 por domicílio. A maioria das criações (87,4%) possui até 40 aves e 77,6% criavam somente galinha doméstica. Os anatídeos (marreco, pato e ganso) estavam presentes em 20,8% domicílios, mas somente em um domicílio a criação era exclusivamente deste tipo de aves.

Os moradores geralmente criavam aves para consumo próprio (96,7%) e faziam reposição própria (86,3%) para manter a criação. A troca e/ou venda de aves e/ou ovos acontecia em 33,9% dos domicílios, sendo a maior parte (87,1%) realizada com os vizinhos. A tendência observada nestes domicílios é de uma leve diminuição ($R^2=0,10$) da troca e/ou venda dos produtos à medida que o número de aves aumenta nos domicílios.

Aves com acesso fora do pátio foram relatadas em 61,7% dos domicílios, sendo que a maioria delas (96,7%) se desloca até 300 metros do domicílio e 32,2% têm contato com as aves dos vizinhos. Em apenas 16,4% dos domicílios foi relatado aves com acesso a banhados e/ou lagoas, porém houve uma associação ($X^2=3,22$) entre a presença de anatídeos e o livre acesso a essas áreas úmidas. Além disso, em cerca de 50% dos domicílios os moradores já avistaram aves silvestres próximas às aves domésticas.

O q2 foi realizado com o objetivo de determinar detalhes do trânsito e contato de aves entre propriedades. Entre os criadores que adquirem ou vendem aves para outros criadores, 34% declararam fazer isto com criadores próximos de suas propriedades (em média de 1 até 3 km). Quando havia compra de aves de outros criadores, esta era realizada principalmente de duas propriedades. A localização destas duas propriedades é visualizada na **Figura 13**.

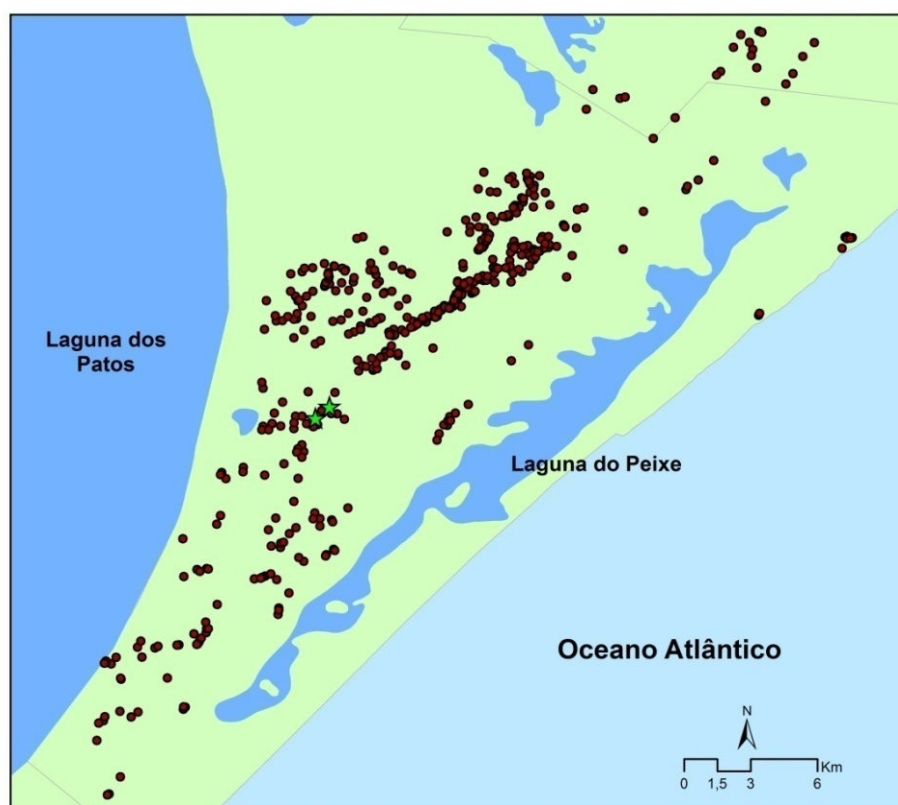


Figura 13- Distribuição geográfica das propriedades que comercializam aves na região de estudo. As estrelas verdes indicam as duas principais propriedades que comercializam aves com vizinhos. Os pontos vermelhos indicam todas as propriedades da região com aves de subsistência.

Cerca de 90% relataram visitar frequentemente vizinhos ou parentes que também criam aves de subsistência. Em 37% das propriedades foi relatado que as aves costumam

circular fora dos limites do pátio e em 27% essas aves tem contato com as aves dos vizinhos, sendo que a distância para contato direto é em torno de 200 a 500 metros. Além disso, 71% dos criadores declararam visualizar aves silvestres em contato com suas aves domésticas.

B) Parâmetros

Foram estimados valores para o modelo referência e valores para a análise de cenários. O valor de R_0 de 2,68 foi utilizado no modelo referência. Este valor foi observado por Ward e colaboradores (2008) em uma investigação de surto de H5N1 em aves de subsistência na Romênia. Os valores extremos para análise de sensibilidade (R_0 de 1,4 e 3,6) foram o menor e o maior valor encontrados por Garske e colaboradores (2006) em análise de surto de HPAIV em aves de subsistência no Canadá. Estes trabalhos foram selecionados por consistirem nos únicos dois relatos com R_0 calculado entre rebanhos em aves de subsistência.

Já as distâncias de contato direto ou indireto entre as propriedades foram estimados a partir da análise dos questionários. No modelo referência foi utilizado um valor de 0,3 km no contato direto e 2 km para o contato indireto. Para a análise de cenários os modelos foram rodados com valores de 0,2 a 0,5 km para distância de contato direto e de 1 a 3 km para distância de contato indireto. O tempo de duração da infecção em cada propriedade foi calculado em 30 dias. Os valores das probabilidades de transmissão do vírus através do contato direto ou indireto foram estabelecidos arbitrariamente em 50%.

C) Simulações

Nas simulações (considerando 92 possibilidades de ponto de entrada em 10 simulações) utilizando-se os parâmetros do modelo referência, observou-se que cerca de 75% (mediana) dos domicílios se tornam infectados até 31º dia de tempo de simulação (**Figura**

14). Além disso, foi possível observar que há um rápido crescimento do número de casos novos (novos domicílios infectados ao longo do tempo) atingindo um pico ao oitavo dia, quando decai até estabilizar-se por volta do 18º dia (**Figura 15**).

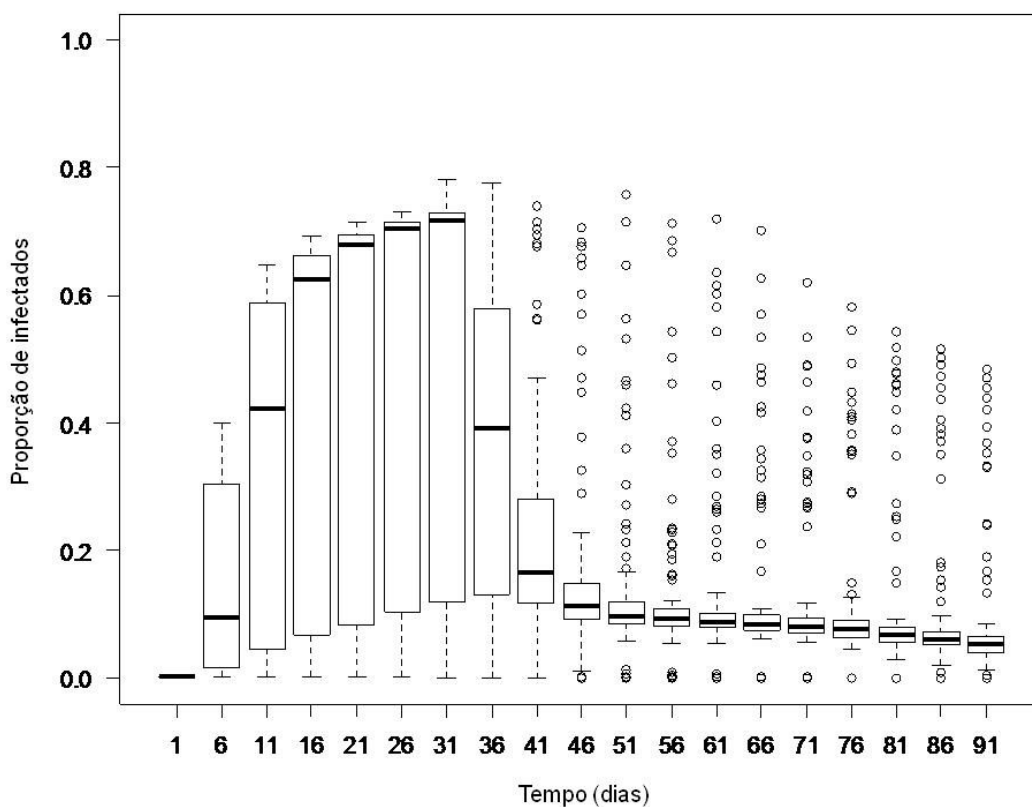


Figura 14- Proporção de propriedades infectadas ao longo do tempo de simulação (10 simulações de 92 pontos de entrada). Parâmetros: modelo referência. A linha dentro da barra indica a mediana, as barras representam os valores do primeiro e terceiro quartis, a linha tracejada indica os *whiskers*, e os pontos representam os *outliers*.

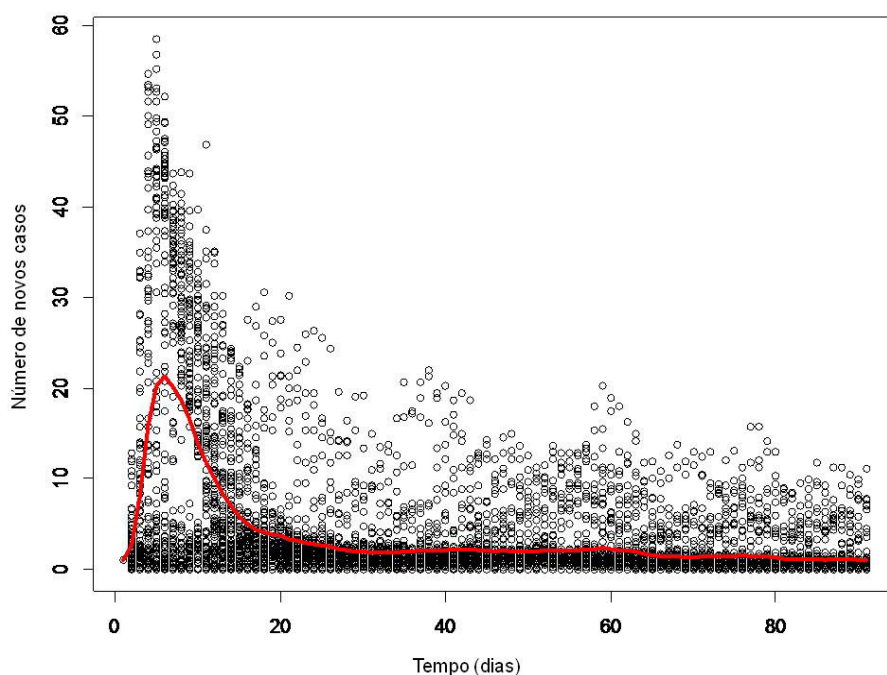


Figura 15- Número de novos casos ao longo do tempo de simulação (10 simulações de 92 pontos de entrada). Parâmetros: modelo referência. Cada ponto representa um domicílio em uma das 920 simulações avaliadas e a linha vermelha representa a média dos novos casos.

A maior parte das simulações dos 92 possíveis pontos de entrada foi capaz de atingir, em média, cerca de 80 a 90% dos domicílios suscetíveis, como evidenciado pela concentração de pontos de entrada próximos ao valor máximo da abscissa (**Figura 16**). Ademais, cerca de 35% dos pontos de entrada do vírus estavam entre 20 a 25 km de distância dos domicílios mais distantes afetados (**Figura 17**).

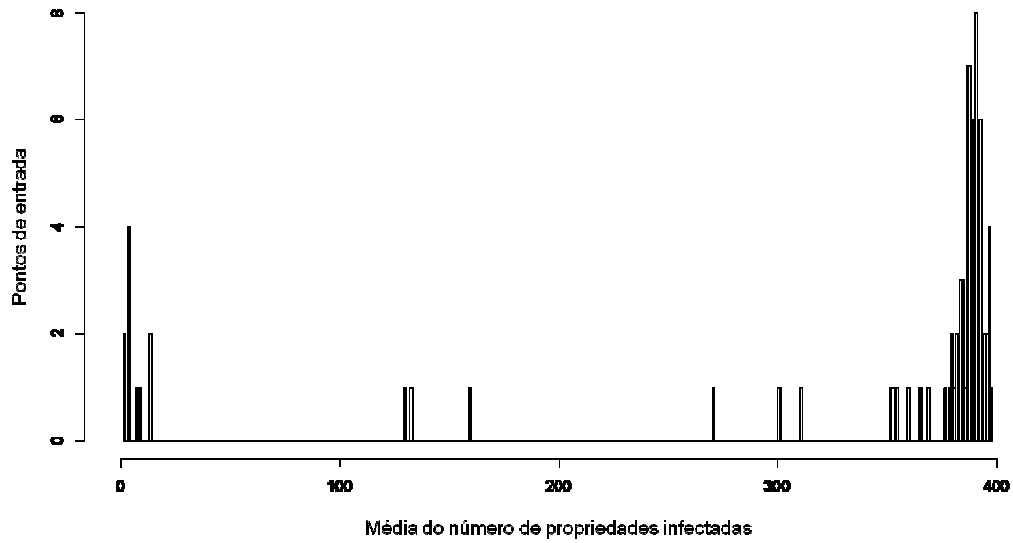


Figura 16- Tamanho da epidemia (média do número de propriedades infectadas ao final da simulação) decorrente de 10 simulações para cada um dos 92 possíveis pontos de entrada. Parâmetros: modelo referência.

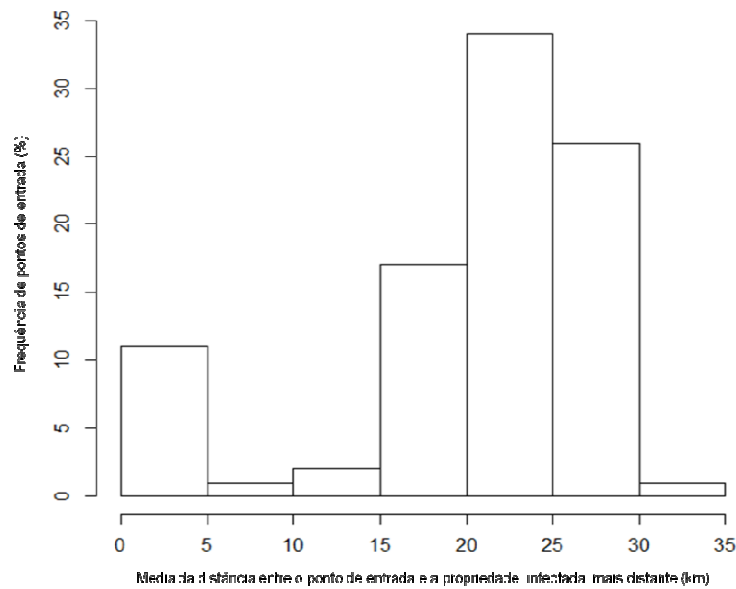


Figura 17- Média da distância entre o ponto de entrada e a propriedade infectada mais distantes considerando 10 simulações para cada um dos 92 possíveis pontos de entrada. Parâmetros: modelo referência.

Na **Figura 18** está demonstrada graficamente a dinâmica dos compartimentos SIR com a proporção das médias de propriedades em cada tempo de simulação. Já a **Figura 19** mostra o exemplo de uma simulação de espalhamento do H5N1 utilizando um possível ponto de entrada (escolhido aleatoriamente entre os domicílios com anatídeos) como caso inicial com os parâmetros inseridos na modelagem de referência.

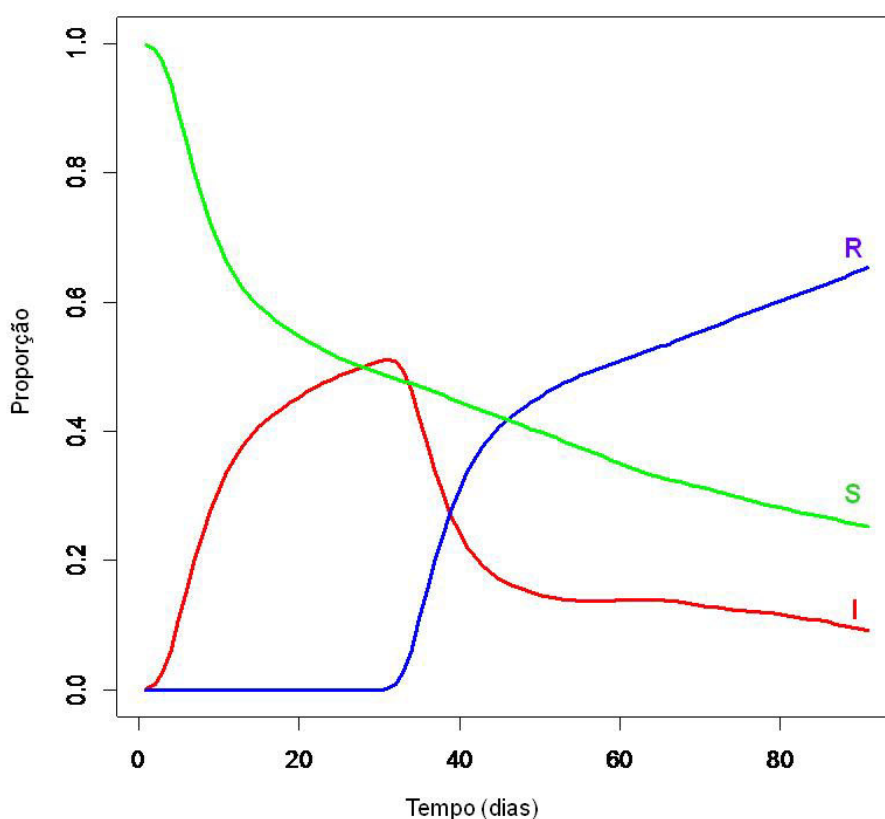


Figura 18- Dinâmica da média dos compartimentos SIR ao longo do tempo de simulação. Linha I: proporção média de domicílios infectados, linha S: proporção média de suscetíveis e linha R: proporção média de recuperados. Parâmetros: modelo referência.

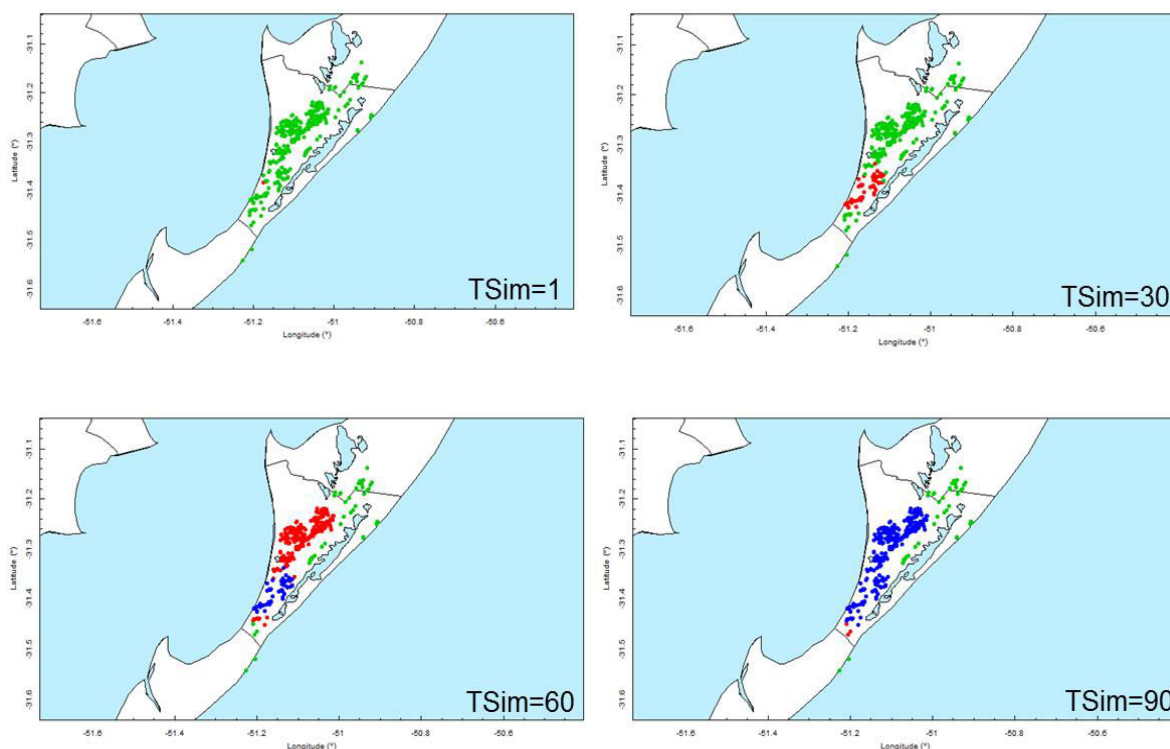


Figura 19– Mapa da simulação da dinâmica de espalhamento de HPAIV na região de estudo nos diferentes tempos de simulação (TSim) em dias. Pontos verdes representam os domicílios suscetíveis, pontos vermelhos representam os domicílios infectados e os pontos azuis representam os domicílios recuperados. O ponto de entrada foi escolhido aleatoriamente nesta simulação. Parâmetros: modelo referência.

D) Análise de cenários e sensibilidade

Dos parâmetros de entrada do modelo investigado, a mudança na distância do contato indireto entre as propriedades foi o que mais afetou a média do número de propriedades infectadas no dia 30 (**Tabela 18**). Um aumento de 20%, por exemplo, no valor de R_0 , distância de contato direto ou na distância de contato indireto ocasiona um incremento de 3,5%, 1,4% ou 11,4% na média do número de propriedades infectadas no dia 30, respectivamente, quando comparados ao modelo referência. A redução de 20% em algum destes valores citados acima gera uma diminuição de 4,8%, 0,9% ou 17,1% na média do

número de propriedades infectadas, respectivamente. O aumento da distância de contato indireto até 3 km pode aumentar cerca de 31% o número de propriedades infectadas.

Tabela 18 – Análise de cenários e seu efeito sobre a média do número de propriedades infectadas em 30 dias.

Modelo	mI30¹	Mudança no parâmetro (%)	Mudança na mI30 (%)	logRR
Referência ²	228	-	-	0
R0 de 1,4	199	-47,76	-12,72	-0,06
R0 de 2,14	217	-20%	-4,82	-0,02
R0 de 3,21	236	+20%	+3,51	0,01
R0 de 3,6	243	+34,33	+6,58	0,03
Contato direto de 0,2Km	226	-33,33%	-0,88	-0,004
Contato direto de 0,24Km	226	-20%	-0,88	-0,004
Contato direto de 0,36Km	231	+20%	+1,36	0,01
Contato direto de 0,5Km	231	+66,66%	+1,36	0,01
Contato indireto de 1Km	148	-50%	-35,09	-0,20
Contato indireto de 1,6Km	189	-20%	-17,11	-0,1
Contato indireto de 2,4Km	254	+20%	+11,40	0,05
Contato indireto de 3Km	300	+50%	+31,58	0,12

¹mI30: média do número de propriedades infectadas no dia 30.

²Modelo referência: R0 de 2,68, distância de contato direto de 300 m e distância de contato indireto de 2 km.

A diferença na capacidade de cada parâmetro modificar a proporção média de infectados pode ser também observada na **Figura 20**. Os valores de R^2 para os parâmetros R_0 , contato direto e contato indireto foram 0,98 ($p < 0,01$), 0,80 ($p = 0,03$) e 0,99 ($p < 0,01$), respectivamente. Isto está de acordo com o efeito das variações deste no parâmetro de saída demonstrado na **Figura 20**.

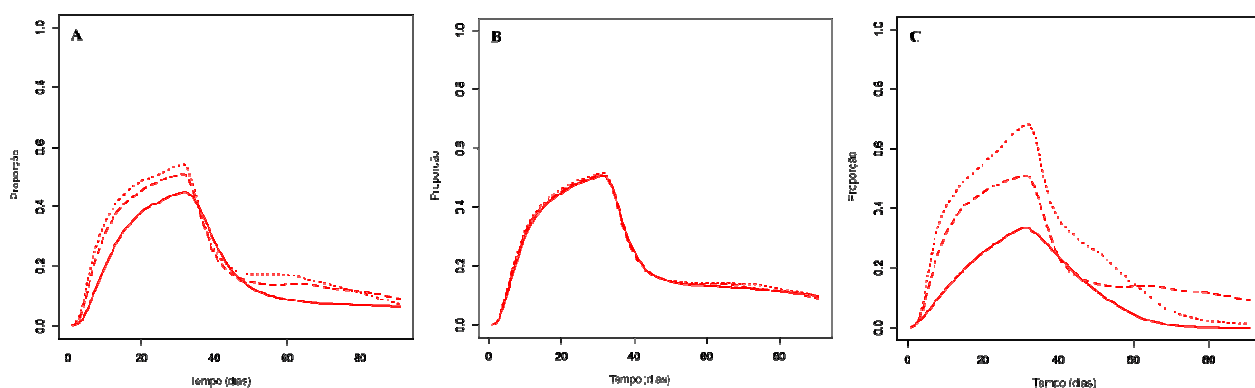


Figura 20– Análise de cenários dos parâmetros de entrada. Os gráficos mostram a variação na média da proporção de domicílios infectados ao longo do tempo quando se variam os valores de R_0 (A), distância de contato indireto (B) e distância de contato direto (C). Gráfico A: R_0 de 3,6 (linha pontilhada), 2,68 (linha tracejada) e 1,4 (linha contínua). Gráfico B: distância de contato direto de 200m (linha pontilhada), 300m (linha tracejada) e 500m (linha contínua). Gráfico c: distância de contato indireto de 3Km (linha pontilhada), 2km (linha tracejada) e 1km (linha contínua).

5.2.3. Discussão e conclusões

A modelagem de espalhamento de doenças é utilizada para simulações de cenários e consequências de um surto, facilitando o planejamento e preparação de estratégias de controle. Isto é particularmente interessante em regiões onde dados de surtos são escassos ou indisponíveis, ou onde a doença é rara ou está ausente (Patyk et al., 2013).

A utilização de um modelo em redes complexas fornece uma dimensão mais real deste cenário por introduzir uma diferente probabilidade de contato entre as propriedades na

simulação (Ossada et al., 2013). Além disso, em um modelo SIR estocástico há a incorporação de elementos de processos aleatórios para a dinâmica, onde a infecção e transição das propriedades de um estado para outro é determinada probabilisticamente.

O espalhamento de uma doença, como a influenza aviária, depende de fatores regionais, como densidade de aves, tipo de produção, localização e presença de fatores de risco para a introdução e transmissão da doença (Patyk et al., 2013). A região de estudo se caracteriza pela presença de criações de aves de subsistência em uma das principais áreas de invernada de aves migratórias, e o risco de introdução de H5N1 e espalhamento deste vírus na região não é desprezível (Corbellini et al., 2012). Isto é reforçado pelo fato da detecção de aves soropositivas para AIV em nosso inquérito epidemiológico, o que torna o local um sítio com comprovada introdução de AIV e importante para aplicação da modelagem de espalhamento da doença.

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que na região estudada e nos parâmetros analisados há um número alto de domicílios que se infectariam rapidamente. Com isso, o número de propriedades suscetíveis cairia e a proporção de recuperados começaria a subir a partir do dia 30 do modelo de referência, ou seja, após o período máximo que um domicílio poderia permanecer infectado. Pelo fato dos domicílios estarem próximos, é possível observar uma disseminação do vírus na região muito rápida e que foi capaz de atingir em média 80 a 90% dos domicílios suscetíveis a cada simulação, e capaz de alcançar uma grande distância entre as propriedades infectadas.

A distância de contato indireto tem papel determinante no modelo espalhamento de H5N1 na região de estudo, ou seja, mudanças neste parâmetro geram impactos consideráveis nos resultados, sendo também o parâmetro que melhor consegue explicar as variações no parâmetro de saída. Esta observação pode ser devida ao fato da simulação ocorrer em

propriedades que criam aves de subsistência. Este tipo de criação possibilita um aumento nos contatos indiretos, principalmente pelas visitas entre vizinhos, contato com aves silvestres e outros animais, e nenhuma aplicação de práticas de biossegurança.

Este resultado reforça a importância já relatada dos fômites no espalhamento de influenza (Alexander, 2003; Halvorson, 2009). Ademais, o contato indireto e a disseminação a longa distância também foi considerada um parâmetro importante na simulação de HPAIV em criações de aves comerciais e de subsistência na Itália e nos EUA (Dorigatti et al., 2010; Patyk et al., 2013). Na Tailândia, a movimentação e atividades entre propriedades com aves de subsistência ou entre mercados de aves vivas foram consideradas importantes na análise de rede utilizada para avaliar o espalhamento de H5N1 (Poolkhet et al., 2013a; Poolkhet et al., 2013b). A modelagem de espalhamento de doenças não prevê os resultados de um surto, e sim é capaz de gerar informações e simular cenários hipotéticos de um possível surto (Keeling & Rohani, 2007) servindo de suporte para uma decisão antecipada, planejamento e preparação de estratégia de prevenção e controle.

A utilização de uma região específica parece facilitar este tipo de modelagem pela confiabilidade das informações incluídas no modelo. Além disso, esta estratégia gera informações de mais fácil aplicação para áreas de risco, considerando suas particularidades.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

É notável a importância da avicultura na economia do país e o impacto da circulação de patógenos de alta patogenicidade em aves domésticas. Os programas de monitoria em granjas comerciais parecem ser uma estratégia imprescindível para prevenção da introdução e disseminação de doenças. Porém, sabe-se que criações de aves de subsistência compõem uma parcela relevante no cenário da avicultura, tornando necessário também uma vigilância neste tipo de criação. As aves de subsistência são criadas para consumo próprio ou venda informal de aves ou ovos em ambientes sem biossegurança e na ausência de infraestrutura adequada. Devido a isto, estas aves de subsistência podem se tornar fonte de disseminação de agentes causadores de doenças em aves.

Vários patógenos se destacam por causar perdas severas quando introduzidos em um plantel suscetível. A introdução nas aves domésticas de patógenos associados a aves migratórias parece ser facilitada na presença de uma interface de aves migratórias e aves domésticas. Pela adequação constante de granjas comerciais aos planos brasileiros de prevenção e controle de doenças, as aves de subsistência parecem ser as mais propensas ao contato com aves silvestres e migratórias. Neste contexto, uma região que serve como sítio de invernada para aves migratórias e apresenta criações de aves de subsistência se torna um ambiente propício para esta troca de patógenos. Este é o caso da região no entorno da Laguna do Peixe, no PNLP. Devido a isto, o conhecimento sobre a circulação de patógenos associados a aves migratórias na região do PNLP contribui significativamente para o planejamento e tomada de decisões referentes ao controle e prevenção de doenças de aves.

Neste trabalho, buscamos avaliar a presença em aves de subsistência na região do PNLP de três microorganismos (AIV, NDV e MG) que causam doença respiratória em aves e que são associados a aves migratórias. Todo o planejamento do estudo foi primeiramente

direcionado ao inquérito de AIV, pois, apesar de não haver indícios da infecção em aves comerciais, nosso grupo já havia demonstrado em uma avaliação de risco qualitativa que o risco de introdução de HPAIV na região através de aves migratórias não é desprezível. Seguindo este raciocínio, além do inquérito para avaliar a presença de AIV, uma simulação do espalhamento do vírus se tornava necessária para responder como o agente se disseminaria na região caso fosse introduzido. Ademais, considerando que há risco de introdução de AIV, não se pode descartar a introdução de outros patógenos associados a aves migratórias com vias de disseminação (respiratória) similares.

Nossas hipóteses eram de que o AIV, assim como NDV e MG, estavam circulando no ecótopo do PNLP, e por este motivo, as aves de subsistência poderiam servir como sentinelas para estes agentes. Ademais, por se tratar de um inquérito de doenças associadas a aves migratórias em um sítio de invernada, acreditava-se que a presença das aves migratórias/silvestres nas propriedades poderia ser um fator de risco para os patógenos. Além disso, consideramos a hipótese de que na introdução de um HPAIV, o espalhamento aconteceria rapidamente e poderia comprometer toda a região.

Esta tese foi dividida em duas partes para melhor compreensão das hipóteses e objetivos propostos. Na primeira parte, descrevemos o inquérito das doenças nas aves de subsistência, juntamente com a avaliação de fatores de risco. Na segunda parte, demonstramos o modelo de simulação de espalhamento e as consequências da introdução de H5N1 nas criações com aves de subsistência da região.

Os resultados do inquérito suportam a hipótese de que há circulação de patógenos associados a aves migratórias (AIV, NDV e MG) na região do PNLP, através da detecção de anticorpos contra estes patógenos nas aves de subsistência. Este fato corrobora com a proposição de que as aves de subsistência da região podem servir como sentinelas para

circulação de patógenos no ecossistema estudado. Assim, é importante considerar que na região do PNLP, as aves de subsistência podem constituir um risco biológico para granjas comerciais e também para as aves migratórias e silvestres, pois podem funcionar com disseminadores de patógenos. Este é outro aspecto da relação ecológica entre aves silvestres e de subsistência frequentemente negligenciado, e que aumenta o rol de impactos negativos ao ecossistema local devido à exploração humana.

A avaliação de fatores de risco somente foi possível para NDV e MG, não sendo possível demonstrar que as aves silvestres constituiriam-se como fatores de risco para as infecções. Porém, o fato da soropositividade de NDV diminuir no aumento da distância das propriedades ao estuário da LP (área com maior concentração de aves migratórias na região) se configura como um indício do possível papel desta fonte de introdução de patógenos. Além deste fator, a presença de anticorpos contra NDV e MG estava associada às características de criação de aves de subsistência, onde não se segue procedimentos de biossegurança. Este trabalho é o primeiro relato na literatura a realizar análise de fatores de risco para MG e o primeiro a demonstrar fatores de risco associados a NDV em aves de subsistência do Brasil.

O achado de propriedades com aves soropositivas para AIV, somado à ausência de relatos de surtos ou detecção direta, é compatível com um ecossistema onde há circulação de vírus de baixa patogenicidade. Isto pode significar que a circulação do agente é subclínica, passando incólume aos produtores e serviço oficial. Contudo, comprova a hipótese de circulação do vírus e de que a região do PNLP pode servir como fonte de entrada e disseminação de AIV. Isto serve de alerta para a real possibilidade de entrada de HPAIV no Brasil através de aves desta região e ressalta a importância do modelo de espalhamento estudado.

A disseminação observada no modelo de simulação de espalhamento de H5N1 demonstra o quão importante é a preparação e treinamento em planos de contingência de AIV. Isto porque, na introdução do agente na região, o vírus tende a se espalhar rapidamente e afetar a maior parte das propriedades com aves. Este padrão de disseminação parece estar intimamente relacionado ao contato indireto entre as propriedades, devido à movimentação de aves, pessoas e fômites entre as propriedades.

O conjunto destes resultados reforça a idéia de que o conhecimento dos fenômenos epidemiológicos locais é de extrema importância científica, sem negligenciar a responsabilidade social (aplicação) com a região de estudo. Apesar de inquéritos e trabalhos como este poderem ser considerados fora do escopo de uma audiência global, o conhecimento de qualquer agente depende da caracterização de sua ecologia nos diferentes locais de ocorrência. E isto serve tanto para modificar a realidade local, como entender a adaptação dos patógenos a diferentes ambientes e variáveis, tornando, assim, o escopo de estudos epidemiológicos global.

Espera-se que o conjunto dos dados desta tese forneça não somente respostas e obtenção de novos conhecimentos e informações científicas, mas também gere novos questionamentos e que possa servir como fonte de informação técnica para programas de vigilância. Nesse contexto, desde 2012, esta metodologia está sendo aplicada pelo MAPA na vigilância epidemiológica para AIV e NDV em sítios de aves migratórias.

REFERÊNCIAS

- Akhtar, S. & Zahid, S. Risk indicators for Newcastle disease outbreaks in broiler flocks in Pakistan. **Prev. Vet. Med.**, v.22, p.61–69, 1995.
- Aldous, E. W. & Alexander, D. J. Technical Review: Detection and differentiation of Newcastle disease virus (*avian paramyxovirus type 1*). **Avian Pathol.**, v.30, p.117–128, 2001.
- Aldous, E. W.; Collins, M. S.; McGoldrick, A.; Alexander, D.J. Rapid pathotyping of Newcastle disease virus (NDV) using fluorogenic probes in a PCR assay. **Vet. Microbiol.**, v.80, p.201–212, 2001
- Aldous, E. W.; Mynn, J.K.; Banks, J.; Alexander, D.J. A molecular epidemiological study of *avian paramyxovirus type 1* (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. **Avian Pathol.**, v.32, p.239–357, 2003.
- Aldous, E. W.; Seekings, J. M.; McNally, A.; Nili, H.; Fuller, C. M.; Irvine, R. M.; Alexander, D. J.; Brown, I. H. Infection dynamics of highly pathogenic avian influenza and virulent *avian paramyxovirus type 1* viruses in chickens, turkeys and ducks. **Avian Pathol.**, v.39, p.265-273, 2010.
- Alexander, D. J. A review of avian influenza in different bird species. **Vet. Microbiol.**, v.74, p.3-13, 2000.
- Alexander, D.J. Newcastle disease, other avian Paramyxoviruses and pneumovirus infections. In: Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. **Diseases of poultry**, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA., p. 63–87, 2003.
- Alexander, D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. **Vaccine**, v.25, p.5637-5644, 2007.
- Alexander, D. J. Ecology and Epidemiology of Newcastle Disease. In: Capua, I.; Alexander, D. J. **Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual**, Springer-Verlag, Itália, p.19-26, 2009.
- Alexander, D. J. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. **Avian Pathol.**,v.40, p.547-558, 2011.

- Alexander, D. J.; Banks, J.; Collins, M. S.; Manvell, R. J.; Frost, K. M.; Speidel, E. C.; Aldous, E. W. Antigenic and genetic characterisation of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. **Vet. Rec.**, v.145, p.417-421, 1999.
- Alexander, D. J.; Brown, I. H. History of highly pathogenic avian influenza. **Rev. Sci. Tech.**, v.28, p.19-38, 2009.
- Alexander, D. J.; Morris, H. T.; Pollitt, W. J.; Sharpe, C. E.; Eckford, R. L.; Sainsbury, R. M. Q.; Mansley, L. M.; Gough, R. E.; Parsons, G.. Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. **Vet. Rec.**, v.143, p.209-212, 1998.
- Alvarez, P.; Mattiello, R.; Rivaller, P.; Pereda, A.; Davis, C. T.; Boado, L.; D'Ambrosio, E.; Aguirre, S.; Espinosa, C.; La Torre, J.; Donis, R.; Mattion, N. First isolation of an H1N1 avian influenza virus from wild terrestrial non-migratory birds in Argentina. **Virology**, v.396, p.76-84, 2010.
- Alves, M.A.S. Sistemas de migrações de aves em ambientes terrestres no Brasil: exemplos, lacunas e propostas para o avanço do conhecimento. **Rev. Bras. Ornitol.**, v.15, p.231-238, 2007.
- Andral B.; Toquin, D.; Madec, F.; Aymard, M.; Gourreau, J.M.; Kaiser, C.; Fontaine, M.; Metz, M.H. Disease in turkeys associated with H1N1 influenza virus following an outbreak of the disease in pigs. **Vet. Rec.**, v.116, p.617-618, 1985.
- Andriamanivo, H.R.; Lancelot, R.; Maminiana, O.F.; Rakotondrafara, T.F.; Jourdan, M.; Renard, J.F.; Gil, P.; de Almeida, R.S.; Albina, E.; Martinez, D.; Tillard, E.; Rakotondravao, R.; Chevalier, V. Risk factors for avian influenza and Newcastle disease in smallholder farming systems, Madagascar highlands. **Prev. Vet. Med.**, v.104, p.114-24, 2012.
- Araújo, F.A.A.; Vianna, R.S.T.; Filho, G.V.A.; Melhado, D.L.; Todeschini, B.; Cavalcante, G.C.E.; Fedrizzi, C.E.; Magalhães, V.S.; Scherer, A.; Almeida, M.A.B.; Portella, A.S.; Santos, E.; Scherer, S.B.; Doretto, L.; Martins, L.C.; Rodrigues, S.G.; Vasconcelos, P.F.C.. Segundo inquérito sorológico em aves migratórias e residentes do Parque Nacional da Lagoa do Peixe/RS para detecção do vírus da febre do Nilo Ocidental e outros vírus. **Boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 4, p.1-8, 2004.

- Arns, C. W.; Spilki, F. R.; Almeida, R. S. *Paramyxoviridae*. In: Flores, E. F. **Virologia Veterinária**, Ed. UFSM, Santa Maria, p. 657-688, 2007.
- ASGAV. 2013. Associação gaúcha de avicultura. Disponível em: www.asgav.com.br
- Awan, M.A.; Otte, M.J.; James, A.D. The epidemiology of Newcastle disease in rural poultry: A review. **Avian Path.**, v.23, p.405-423, 1994.
- Azevedo Jr., S.M. Aves migratórias e a influenza aviária no Brasil. **Anais do XV Congresso Brasileiro de Ornitologia**. Porto Alegre: PUCRS, 2007. 250 p.
- Back, A. **Manual de doenças de aves**. Ed. Coluna do Saber, Cascavel, 2004, 220p.
- Banks, J.; Speidel, E. S.; Moore, E.; Plowright, L.; Piccirillo, A.; Capua, I.; Cordioli, P.; Fioretti, A.; Alexander, D. J. Changes in the haemagglutinin and the neuraminidase genes prior to the emergence of highly pathogenic H7N1 avian influenza viruses in Italy. **Arch. Virol.**, v.146, p.963-973, 2001.
- Barros, A.J. & Hirakata, V.N. Alternatives for logistic regression in cross-sectional studies: an empirical comparison of models that directly estimate the prevalence ratio. **BMC Med. Res. Methodol.**, v.3, p.21, 2003.
- Bavinck, V.; Bouma, A.; van Boven, M.; Bos, M. E.; Stassen, E.; Stegeman, J. A. The role of backyard poultry flocks in the epidemic of highly pathogenic avian influenza virus (H7N7) in the Netherlands in 2003. **Prev. Vet. Med.**, v.88, p.247-254, 2009.
- Beard, C. W. Demonstration of type-specific influenza antibody in mammalian and avian sera by immunodiffusion. **Bull. World Health Organ.**, v.42, p.779-785, 1970.
- Bencina, D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. **Avian Pathol.**, v.31, p.535-547, 2002.
- Bencina, D.; Dorrer, D.; Tadina, T. *Mycoplasma* species isolated from six avian species. **Avian Pathol.**, v.6, p.653-664, 1987.
- Bencke, G. A., Maurício, G. N.; Develey, P. F; Goerck, J. M. (orgs.). **Áreas Importantes para a Conservação das Aves no Brasil. Parte I – Estados do Domínio da Mata Atlântica**. São Paulo: SAVE Brasil, 2006.
- Bencke, G. A.; Ramos, R. A.; Moura, L. A. (orgs). Aves. In: **Biodiversidade: regiões da Lagoa do Casamento e dos Butiazais de Tapes, planície costeira do Rio Grande do Sul**. Brasília: MMA/SBF, 2007, 388p.

- Biswas, P.K.; Barua, H.; Uddin, G.M.; Biswas, D.; Ahad, A.; Debnath, N.C. Serosurvey of five viruses in chickens on smallholdings in Bangladesh. **Prev. Vet. Med.**, v.88(1), p.67-71, 2009.
- Biswas, P.K.; Rahman, M.H.; Das, A.; Ahmed, S.S.; Giasuddin, M.; Christensen, J.P. Risk for highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection in chickens in small-scale commercial farms, in a high-risk area, Bangladesh, 2008. **Transbound. Emerg. Dis.**, v.58(6), p.519-25, 2011.
- Borne, P. M.; Comte, S. **Vacinas e vacinação na produção avícola**. Gessulli guias, SP-Ceva, 2003, 140p.
- Bos, M. E.; van Boven, M.; Nielen, M.; Bouma, A.; Elbers, A. R.; Nodelijk, G.; Koch, G.; Stegeman, A.; de Jong, M. C. Estimating the day of highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus introduction into a poultry flock based on mortality data. **Vet. Res.**, v.38, p.493-504, 2007.
- Bos, M.E.; Nielen, M.; Koch, G.; Bouma, A.; de Jong, M.C.M.; Stegeman, A. Back-calculation method shows that within-flock transmission of highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus in the Netherlands is not influenced by housing risk factors. **Prev. Vet. Med.**, v.88, p.278-285, 2009.
- Bos, M.E.; Nielen, M.; Koch, G.; Stegeman, A.; de Jong, M.C.M. Effect of H7N1 vaccination on highly pathogenic avian influenza H7N7 virus transmission in turkeys. **Vaccine**, v.26, p.6322-6328, 2008.
- Bouma, A.; Claassen, I.; Natih, K.; Klinkenberg, D.; Donnelly, C.A.; Koch, G.; van Boven, M. Estimation of transmission parameters of H5N1 avian influenza virus in chickens. **PLoS Pathog.**, v.5, e1000281, 2009.
- Bozeman, L. H.; Kleven, S. H.; Davis, R. B. *Mycoplasma* challenge studies in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) and chickens. **Avian Dis.**, v.28, p.426-434, 1984.
- Brown, J. D.; Luttrell, M. P.; Uhart, M. M.; del Valle Ferreyra, H.; Romano, M. M.; Rago, M. V.; Stallknecht, D. E. Antibodies to type A influenza virus in wild waterbirds from Argentina. **J. Wildl. Dis.**, v.46, p.1040-1045, 2010.
- Brown, J. D.; Swayne, D. E.; Cooper, R. J.; Burns, R. E.; Stallknecht, D. E. Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. **Avian Dis.**, v.51, p.285-289, 2007.
- Buchala, F. G.; Ishizuka, M. M.; Mathias, L. A., Berchieri Jr, A.; Castro, A.G.M.; Cardoso, A.L.S.P.; Tessari, E.N.C.; Kanashiro, A.M.I. Detecção sorológica contra *Mycoplasma* em

- aves de criatórios de “fundo de quintal” próximos a explorações comerciais do estado de São Paulo. **Arq. Inst. Biol.**, v.73, p.143-148, 2006.
- Caldarelli, G. Scale-free networks. Oxford University Press. 2007.
- Callison, S. A.; Riblet, S.; Sun, S.; Ikuta, N.; Hilt, D.; Leiting, V.; Kleven, S.; Suarez, D. L.; Garcia, M. Development and Validation of a Real-Time Taqman Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of *Mycoplasma gallisepticum* in Naturally Infected Birds. **Avian Dis.**, v.50, p.537-544, 2006.
- Capua, I.; Alexander, D. J. Human health implications of avian influenza viruses and paramyxoviruses. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.23, p.1-6, 2004.
- Capua, I.; Marangon, S. Avian influenza in Italy (1999 /2000): a review. **Avian Pathol.**, v.29, p.289-294, 2000.
- Capua, I.; Scacchia, M.; Toscani, T.; Caporale, V. Unexpected isolation of virulent Newcastle disease virus from commercial embryonated fowls' eggs. **J. Vet. Med. B**, v.40, p.609-612, 1993.
- Capua, I.; Terregino, C. Clinical Traits and Pathology of Avian Influenza Infections, Guidelines for Farm Visit and Differential Diagnosis. In: Capua, I.; Alexander, D. J. **Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual**. Springer-Verlag, Itália, p.45-72, 2009.
- Cattoli, G.; Capua, I. Molecular diagnosis of avian influenza during an outbreak. **Dev. Biol. (Basel)**, v.124, p.99-105, 2006.
- Chaka, H., Goutard, F., Roger, F., Bisschop, S.P., Thompson, P.N. Household-level risk factors for Newcastle disease seropositivity and incidence of Newcastle disease virus exposure in backyard chicken flocks in Eastern Shewa zone, Ethiopia. **Prev. Vet. Med.**, v.109, p.312-320, 2013.
- Chaka, H.; Goutard, F.; Bisschop, S.P.; Thompson, P.N. Seroprevalence of Newcastle disease and other infectious diseases in backyard chickens at markets in Eastern Shewa zone, Ethiopia. **Poult. Sci.**, v.91, p.862-869, 2012.
- Chen, Y.; Liang, W.; Yang, S.; Wu, N.; Gao, H.; Sheng, J.; Yao, H.; Wo, J.; Fang, Q.; Cui, D.; Li, Y.; Yao, X.; Zhang, Y.; Wu, H.; Zheng, S.; Diao, H.; Xia, S.; Zhang, Y.; Chan, K. H.; Tsoi, H. W.; Teng, J. L.; Song, W.; Wang, P.; Lau, S. Y.; Zheng M.; Chan, J. F.; To, K. K.; Chen, H.; Li, L.; Yuen, K. Y. Human infections with the emerging avian influenza

- A H7N9 virus from wet market poultry: clinical analysis and characterisation of viral genome. **Lancet.**, v.381(9881), p.1916-25, 2013.
- Choi, Y. K., J. H. Lee, G. Erickson, S. M. Goyal, H. S. Joo, R. G. Webster, and J. W. Webby. H3N2 influenza virus transmission from swine to turkeys, United States. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.2156–2160, 2004.
- Clark, L.; Hall. J. Avian influenza in wild birds: status as reservoirs, and risks to humans and agriculture. **Ornithol. Monographs**, v.60, p.3-29, 2006.
- Collins, M. S.; Alexander, D. J.; Brockman, S.; Kemp, P. A.; Manvell, R. Evaluation of mouse monoclonal antibodies raised against a variant *avian paramyxovirus type 1* responsible for the current panzootic in pigeons. **Arch. Virol.**, v.104, p.53-61, 1989.
- Collins, M. S.; Bashiruddin, J. B, Alexander, D. J. Deduced amino acid sequences at the fusion protein cleavage site of Newcastle disease viruses showing variation in antigenicity and pathogenicity. **Arch. Virol.**, v.128, p.363-370, 1993.
- Collins, M.S.; Franklin, S.; Strong, I.; Meulemans, G.; Alexander, D.J. Antigenic and phylogenetic studies on a variant Newcastle disease virus using anti-fusion protein monoclonal antibodies and partial sequencing of the fusion protein gene. **Avian Pathol.**, v.27, p.90-96, 1998.
- Comin, A.; Klinkenberg, D.; Marangon, S.; Toffan, A.; Stegeman, A. Transmission dynamics of low pathogenicity avian influenza infections in Turkey flocks. **PLoS One**, v.6, e26935, 2011.
- Cookson, K. C.; Shivaprasad, H. L. *Mycoplasma gallisepticum* infection in chukar partridges, pheasants, and peafowl. **Avian Dis.**, v.38, p.914-921, 1994.
- Coonrod, J. D.; Karathanasis, P.; Betts, R. F.; Donofrio, J. C. Enzyme-linked immunosorbent assay of core antigens for clinical diagnosis of influenza. **J. Med. Virol.**, v. 25, p.399-409, 1988.
- Corbellini, L. G.; Pellegrini, D. C.; Dias, R. A.; Reckziegel, A.; Todeschini, B.; Bencke, G. A. Risk Assessment of the Introduction of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza as a Tool to be Applied in Prevention Strategy Plan. **Transbound. Emerg. Dis.**, 2012.
- Corzo, C.A.; Gramer, M.; Lauer, D.; Davies, P.R. Prevalence and risk factors for H1N1 and H3N2 influenza A virus infections in Minnesota turkey premises. **Avian Dis.**, v.56(3), p.488-93, 2009.

- Czifra, G.; Tuboly, T.; Sundquist, B. G.; Stipkovits, L. Monoclonal antibodies to *Mycoplasma gallisepticum* membrane proteins. **Avian Dis.**, v.37, p.689-696, 1993.
- de Jong, M. C. M.; Diekmann, O. A method to calculate - for computer-simulated infections - the threshold value R_0 , that predicts whether or not the infection will spread. **Prev. Vet. Med.**, v.12, p. 269–285, 1992.
- de Jong, M. C. M.; Hien, T. T. Avian influenza A (H5N1). **J. Clin. Virol.**, v.35, p.2-13, 2006.
- Dent, J.E.; Kiss, I.Z.; Kao, R.R.; Arnold, M. The potential spread of highly pathogenic avian influenza virus via dynamic contacts between poultry premises in Great Britain. **BMC Vet. Res.**, v.7, p.59, 2011.
- Desvaux, S.; Grosbois, V.; Pham, T.T.; Fenwick, S.; Tollis, S.; Pham, N.H.; Tran, A.; Roger, F. Risk factors of highly pathogenic avian influenza H5N1 occurrence at the village and farm levels in the Red River Delta Region in Vietnam. **Transbound. Emerg. Dis.**, v.58(6), p.492-502, 2011.
- Dhama, K.; Mahendran, M.; Tomar, S. Pathogens transmitted by migratory birds: threat perceptions to poultry health and production. **Int. J. Poult. Sci.**, v.7(6), p.516-525, 2008.
- Dhondt, A.A.; Tessaglia, D.L.; Slothower, R.L. Epidemic mycoplasmal conjunctivitis in housefinches from eastern North America. **J. Wildl. Dis.**, v.34, p.265–280, 1998.
- Dohoo, I. R.; Martin, W.; Stryhn, H. E. Veterinary epidemiologic research. 2003, 727p.
- Dorea, F. C.; Vieira, A. R.; Hofacre, C.; Waldrip, D.; Cole, D. J. Stochastic model of the potential spread of highly pathogenic avian influenza from an infected commercial broiler operation in Georgia. **Avian Dis.**, v.54, p.713-719, 2010.
- Dorea, F.C.; Vieira, A.R.; Hofacre, C.; Waldrip, D.; Cole, D.J. Stochastic model of the potential spread of highly pathogenic avian influenza from an infected commercial broiler operation in Georgia. **Avian Dis.**, v.54(1 Suppl), p.713-9, 2010.
- Dorigatti, I.; Mulatti, P.; Rosà, R.; Pugliese, A.; Busani, L. Modelling the spatial spread of H7N1 avian influenza virus among poultry farms in Italy. **Epidemics**, v.2(1), p.29-35, 2010.
- Duckworth, R.A.; Badyaev, A.V.; Farmer, K. L.; Hill, G.E.; Roberts, S.R. First case of *Mycoplasma gallisepticum* infection in the western range of the house finch (*Carpodacus mexicanus*). **Auk.**, v.120, p.528-530, 2003.

- East, I.; Kite, V.; Daniels, P.; Garner, G. A cross-sectional survey of Australian chicken farms to identify risk factors associated with seropositivity to Newcastle-disease virus. **Prev. Vet. Med.**, v. 77, p. 199-214, 2006.
- El Shater, S. A. A. *Mycoplasma* infection in greater flamingo, grey Chinese goose and white pelican. **Vet. Med. J. Giza**, v.44, p.31-36, 1996.
- Faustino, C.R.; Jennelle, C.S.; Connolly, V.; Davis, A.K.; Swarthout, E.C.; Dhondt, A.A.; Cooch, E.G. *Mycoplasma gallisepticum* infection dynamics in a house finch population: seasonal variation in survival, encounter and transmission rate. **J. Anim. Ecol.**, v.73, p.651-669, 2004.
- Feare, C. J. Role of wild birds in the spread of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 and implications for global surveillance. **Avian Dis.**,v.54, p.201-212,2010.
- Fielding, R.; Bich, T. H.; Quang, L. N.; Lam, W. W.; Leung, G. M.; Tien, T. Q.; Ho, E. Y.; Anht le, V. Live poultry exposures, Hong Kong and Hanoi, 2006. **Emerg. Infect. Dis.**, v.13, p.1065-1067, 2007.
- Forleo-Neto, E.; Halker, E.; Santos, V. J.; Pava, T. M.; Toniolo-Neto, J. Influenza. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, p.267-274, 2003.
- Garske, T.; Clarke, P.; Ghani, A.C. The transmissibility of highly pathogenic avian influenza in commercial poultry in industrialised countries. **PLoS One**, v.2, e349, 2007.
- Gerganov, G. Retention of the Newcastle disease virus in immunized poultry. **Vet. Med. Nauki.**, v.15, p.61-69, 1978.
- Gherssi, B. M.; Blazes, D. L.; Icochea, E.; Gonzalez, R. I.; Kochel, T.; Tinoco, Y.; Sovero, M. M.; Lindstrom, S.; Shu, B.; Klimov, A.; Gonzalez, A. E.; Montgomery, J. M. Avian influenza in wildbirds, central coast of Peru. **Emerg. Infect. Dis.**, v.15, p.935-938, 2009.
- Gherssi, B. M.; Sovero, M. M.; Icochea, E.; Gonzalez, R. I.; Blazes, D. L.; Gonzalez, A. E.; Montgomery, J. M. Isolation of low-pathogenic H7N3 avian influenza from wild birds in Peru. **J. Wildl. Dis.**, v.47, p.792-795, 2011.
- Gilbert, M.; Chaitaweesub, P.; Parakamawongsa, T.; Premasathira, S.; Tiensin, T.; Kalpravidh, W.; Wagner, H.; Slingenbergh, J. Free-grazing ducks and highly pathogenic avian influenza, Thailand. **Emerg. Infect. Dis.**, v.12(2), p.227-234, 2006.
- Gilbert, M.; Xiao, X.; Pfeiffer, D. U.; Epprecht, M.; Boles, S.; Czarnecki, C.; Chaitaweesub, P.; Kalpravidh, W.; Minh, P. Q.; Otte, M. J.; Martin, V.; Slingenbergh, J. Mapping

- H5N1 highly pathogenic avian influenza risk in Southeast Asia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.105, p.4769-4774, 2008.
- Glaser, L. C.; Barker, I. K.; Weseloh, D. V.; Ludwig, J.; Windingstad, R. M.; Key, D. W.; Bollinger, T. K. The 1992 epizootic of Newcastle disease in double-crested cormorants in North America. **J. Wildl. Dis.**, v.35, p.319-330, 1999.
- Gohm, D.S.; Thur, B.; Hofmann, M.A. Detection of Newcastle disease virus in organs and faeces of experimentally infected chickens using RT-PCR. **Avian Pathol.**, v.29, p.143–152, 2000.
- Gonçalves, M.S.S. **Ecologia e conservação de aves dos ecossistemas associados ao estuário do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Brasil.** Dissertação de mestrado. Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS). 2009, 67 p.
- Grisi-Filho, J.H.; Amaku, M.; Ferreira, F.; Dias, R.A.; Neto, J.S.; Negreiros, R.L.; Ossada, R. Detecting livestock production zones. **Prev. Vet. Med.**, v.110(3-4), p.304-11, 2013a.
- Grisi-Filho, J.H.; Ossada, R.; Ferreira, F.; Amaku, M. Scale-free networks with the same degree distribution: Different structural properties. **Phys. Res. Int.**, ID 234180, 2013b.
- Ha, Y.; Stevens, D.J.; Skehel, J.J.; Wiley, D.C. H5 avian and H9 swine influenza virus haemagglutinin structures: possible origin of influenza subtypes. **EMBO J.**, v.21, p.865–875, 2002.
- Halvorson, D.A. Prevention and management of avian influenza outbreaks: experiences from the United States of America. **Rev. Sci. Tech.**, v.28(1), p.359-369, 2009.
- Hamilton-West, C.; Rojas, H.; Pinto, J.; Orozco, J.; Hervé-Claude, L. P.; Urcelay, S. Characterization of backyard poultry production systems and disease risk in the central zone of Chile. **Res. Vet. Sci.**, v.93(1), p.121-4. 2011.
- Hayes, F.E. Definitions for migrant birds: what is a neotropical migrant? **Auk.**, v.112, p.521-523, 1995.
- Heffernan, J. M.; Smith, R. J.; Wahl, L. M. Perspectives on the basic reproductive ratio. **J. R. Soc. Interface**, v.2, p.281-293, 2005.
- Hénaux, V.; Samuel, M. D.; Bunck, C. M. Model-based evaluation of highly and low pathogenic avian influenza dynamics in wild birds. **PLoS One**, v.5, e10997, 2010.
- Henning, J.; Henning, K. A.; Morton, J. M.; Long, N. T.; Ha, N. T.; Vu le, T.; Vu, P. P.; Hoa, D. M.; Meers, J. Highly pathogenic avian influenza (H5N1) in ducks and in-contact

- chickens in backyard and smallholder commercial duck farms in Viet Nam. **Prev. Vet. Med.**, v.101, p.229-240, 2011.
- Hernandez-Divers, S. M.; Villegas, P.; Jimenez, C.; Hernandez-Divers, S. J.; Garcia, M.; Riblet, S. M.; Carroll, C. R.; O'Connor, B. M.; Webb, J. L.; Yabsley, M. J.; Williams, S. M.; Sanchez, S. Backyard chicken flocks pose a disease risk for neotropic birds in Costa Rica. **Avian Dis.**, v.52, p.558-566, 2008.
- Hernandez-Divers, S.M.; Villegas, P.; Prieto, F.; Unda, J.C.; Stedman, N.; Ritchie, B.; Carroll, R.; Hernandez-Divers, S.J. A Survey of selected avian pathogens of backyard poultry in Northwestern Ecuador. **J. Avian Med. Surg.**, v.20, p.147-158, 2006.
- Herrero, M.; Suzuki, K.; Origlia, J.; Nunez, L.; Faccioli, M.; Silva, M.; Caballero, J.; Valiente, O.; Álvarez, F. Probability mapping for *Mycoplasma gallisepticum* risk in backyard chickens in Paraguay. **Int. J. Poultry Sci.**, v.8, p.565-569, 2009.
- Hietala, S.K.; Hullinger, P.J.; Crossley, B.M.; Kinde, H.; Ardans, A.A. Environmental air sampling to detect exotic Newcastle disease virus in two California commercial poultry flocks. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v.17, p.198–200, 2005.
- Hoque, M. A.; Burgess, G. W.; Karo-Karo, D.; Cheam, A. L.; Skerratt, L. F. Monitoring of wildbirds for Newcastle disease virus in north Queensland, Australia. **Prev. Vet. Med.**, v.103, p.49-62, 2012.
- Hubálek, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **J. Wildl. Dis.**, v.40, p.639-659, 2004.
- Hulse-Post, D. J.; Sturm-Ramirez, K. M.; Humberd, J.; Seiler, P.; Govorkova, E. A.; Krauss, S.; Scholtissek, C.; Puthavathana, P.; Buranathai, C.; Nguyen, T. D.; Long, H. T.; Naipospos, T. S.; Chen, H.; Ellis, T. M.; Guan, Y.; Peiris, J. S.; Webster, R. G. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.102, p.10682-10687, 2005.
- Hurtado, P. The potential impact of disease on the migratory structure of a partially migratory passerine population. **Bull. Math. Biol.**, v.70, p.2264-2282, 2008.
- IBGE, 2013. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo Agropecuário. Disponível em: <http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp>
- ICTV Master Species List, 2012. International Committee on Taxonomy of Viruses. Disponível em <http://talk.ictvonline.org/default.aspx>

- Ito, T.; Suzuki, Y.; Mitnaul, L.; Vines, A.; Kida, H.; Kawaoka, Y. Receptor specificity of influenza A viruses correlates with the agglutination of erythrocytes from different animal species. **Virology**, v.227, p.493-499, 1997.
- Jackson, D.S.; Nydam, D.V.; Altier, C. Prevalence and risk factors for brucellosis in domestic yak *Bos grunniens* and their herders in a transhumant pastoralist system of Dolpo, Nepal. **Prev. Vet. Med.**, v.113(1), p.47-58, 2014.
- Johnston, S. L. & Bloy, H. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for detection of influenza A virus. **J. Clin. Microbiol.**, v.31, p.142-143, 1993.
- Johnston, S. L. & Siegel, C. S. A comparison of direct immunofluorescence, shell vial culture, and conventional cell culture for the rapid detection of influenza A and B. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.14, p.131-134, 1991.
- Jorgensen, P. H.; Handberg, K. J.; Ahrens, P.; Hansen, H. C.; Manvell, R. J.; Alexander, D. J. An outbreak of Newcastle disease in free-living pheasants (*Phasianus colchicus*). **Zentralbl. Veterinarmed. B**, v.46, p.381-387, 1999.
- Kapczynski, D. R.; Gonder, E.; Tilley, B.; Hernandez, A.; Hodgson, J.; Wojcinski, H.; Jiang, H.; Suarez, D. L. Pandemic H1N1 influenza virus in Chilean commercial turkeys with genetic and serologic comparisons to U.S. H1N1 avian influenza vaccine isolates. **Avian Dis.**, v.55, p.633-641, 2011.
- Kawamoto, A. H.N.; Mancini, D.A. P.; Pereira, L. E.; Cianciarullo, A.M.; Cruz, A.S.; Dias, A.L.F.; Mendonça, R. M. Z.; Pinto, J.R. Investigation of influenza in migrating birds, the primordial reservoir and transmitter of influenza in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.36, p.88-93, 2005.
- Keawcharoen, J.; van den Broek, J.; Bouma, A.; Tiensin, T.; Osterhaus, A.D.; Heesterbeek, H. Wild birds and increased transmission of highly pathogenic avian influenza (H5N1) among poultry, Thailand. **Emerg. Infect. Dis.**, v.17(6), p.1016-22, 2011.
- Keeling, M. J. & Eames, K. T. Networks and epidemic models. **J. R. Soc. Interface**, v.2(4), p. 295-307, 2005.
- Keeling, M. J. & Rohani, P. **Modelling Infectious Diseases in Humans and Animals**. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, 2007, 408p.
- Kelly, P.J.; Chitauru, D.; Rohde, C.; Rukwava, J.; Majok, A.; Davelaar, F.; Mason, P.R. Diseases and management of backyard chicken flocks in Chitungwiza, Zimbabwe. **Avian Dis.**, v.38, p.626-629, 1994.

- Kermack, W.O. & McKendrick, A.G. A contribution to the mathematical theory of epidemics. **Proc. R. S. London A**, v.115(72), p.700–721, 1927.
- Kim, J. K.; Negovetich, N. J.; Forrest, H. L.; Webster, R. G. Ducks: the "Trojan horses" of H5N1 influenza. **Influenza Other Respir. Viruses**, v.3, p.121-128, 2009.
- Kim, L. M.; King, D. J.; Curry, P. E.; Suarez, D. L.; Swayne, D. E.; Stallknecht, D. E.; Slemons, R. D.; Pedersen, J. C.; Senne, D. A.; Winker, K.; Afonso, C. L. Phylogenetic diversity among low-virulence newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. **J. Virol.**, v.81, p.12641-12653, 2007.
- Kleven, S. H. Control of avian mycoplasma infections in commercial poultry. **Avian Dis.**, v.52, p.367-374, 2008.
- Kleven, S. H. Mycoplasmosis. In: Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. **Diseases of poultry**, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA., p.119-121, 2003.
- Kleven, S. H.; Fulton, R. M.; García, M.; Ikuta, N.; Leiting, V. A.; Liu, T.; Ley, D. H.; Opengart, K. N.; Rowland, G. N.; Wallner-Pendleton, E. Molecular characterization of *Mycoplasma gallisepticum* isolates from turkeys. **Avian Dis.**, v.48, p.562-569, 2004.
- Knak, R.B. **Plano de Manejo do Parque Nacional da Lagoa do Peixe – Fase 2**. Brasília: FNMA-FURG-IBAMA-NEMA-UFPel. 1999.
- Komar N. West Nile virus surveillance using sentinel birds. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.951, p.58-73, 2001.
- Krauss, S.; Walker, D.; Pryor, S. P.; Niles, L.; Chenghong, L.; Hinshaw, V.S.; Webster, R. G. Influenza A viruses of migrating wild aquatic birds in North America. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v.4, p.177–189, 2004.
- Kwon, Y. K.; Swayne, D. E. Different routes of inoculation impact infectivity and pathogenesis of H5N1 high pathogenicity avian influenza virus infection in chickens and domestic ducks. **Avian Dis.**, v.54, p.1260-1269, 2010.
- Lamb, R. A.; Parks, G. D. *Paramixoviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. **Fields Virology**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1449-1496, 2007.
- Lee, C. W.; Senne, D. A.; Suarez, D. L. Effect of vaccine use in the evolution of Mexican lineage H5N2 avian influenza virus. **J. Virol.**, v.78, p.8372-8381, 2004.

- Lee, M. S.; Chang, P. C.; Shien, J. H.; Cheng, M. C.; Shieh, H. K. Identification and subtyping of avian influenza viruses by reverse transcription-PCR. **J. Virol. Methods**, v.97, p.13-22, 2001.
- Levisohn, S.; Kleven, S. H. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). **Rev. Sci. Tech.**, v.19, p.425-442, 2000.
- Ley, D. H. *Mycoplasma gallisepticum* Infection. In: Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R.; Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. **Diseases of poultry**, 11th ed., Iowa State University Press, Ames, IA., p.722-744, 2003.
- Li Q.; Zhou, L.; Zhou, M.; Chen, Z.; Li, F.; Wu, H.; Xiang, N.; Chen, E.; Tang, F.; Wang, D.; Meng, L.; Hong, Z.; Tu, W.; Cao, Y.; Li, L.; Ding, F.; Liu, B.; Wang, M.; Xie, R.; Gao, R.; Li, X.; Bai, T.; Zou, S.; He, J.; Hu, J.; Xu, Y.; Chai, C.; Wang, S.; Gao, Y.; Jin, L.; Zhang, Y.; Luo, H.; Yu, H.; He, J.; Li, Q.; Wang, X.; Gao, L.; Pang, X.; Liu, G.; Yan, Y.; Yuan, H.; Shu, Y.; Yang, W.; Wang, Y.; Wu, F.; Uyeki, T.M.; Feng, Z. Epidemiology of human infections with avian influenza A (H7N9) virus in China. **N. Engl. J. Med.**, v.370(6), p.520-32, 2014.
- Li, X.; Chai, T.; Wang, Z.; Song, C.; Cao, H.; Liu, J.; Zhang, X.; Wang, W.; Yao, M.; Miao, Z. Occurrence and transmission of Newcastle disease virus aerosol originating from infected chickens under experimental conditions. **Vet. Microbiol.**, v.136, p.226-232, 2009.
- Lierz, M.; Hagen, N.; Hernandez-Divers, S. J.; Hafez, H. M. Occurrence of mycoplasmas in free-ranging birds of prey in Germany. **J. Wildl. Dis.**, v.44, p.845-850, 2008.
- Lipatov, A. S.; Govorkova, E. A.; Webby, R. J.; Ozaki, H.; Peiris, M.; Guan, Y.; Poon, L.; Webster, R. G. Influenza: emergence and control. **J. Virol.**, v.78, p.8951-8959, 2004.
- Liu, H.; Wang, Z.; Wang, Y.; Sun, C.; Zheng, D.; Wu, Y. Characterization of Newcastle disease virus isolated from waterfowl in China. **Avian Dis.**, v.52, p.150-155, 2008.
- Lu, H.; Castro, A. E. Evaluation of the infectivity, length of infection, and immune response of a low-pathogenicity H7N2 avian influenza virus in specific-pathogen-free chickens. **Avian Dis.**, v.48, p.263-270, 2004.
- Ma, J.; van den Driessche, P.; Willeboordse, F.H. The importance of contact network topology for the success of vaccination strategies. **J. Theor. Biol.**, v.325, p.12-21, 2013.

- Madsen, J.M.; Zimmermann, N.G.; Timmons, J.; Tablante, N.L. Prevalence and differentiation of diseases in Maryland backyard flocks. **Avian Dis.**, v.57(3), p.587-94, 2013.
- Magalhães, R. J. S.; Pfeiffer, D. U.; Otte, J. Evaluating the control of HPAIV H5N1 in Vietnam: virus transmission within infected flocks reported before and after vaccination. **BMC Vet. Res.**, v.5, p.6-31, 2010.
- Mannelli, A.; Busani, L.; Toson, M.; Bertolini, S.; Marangon, S. Transmission parameters of highly pathogenic avian influenza (H7N1) among industrial poultry farms in northern Italy in 1999-2000. **Prev. Vet. Med.**, v.81, p.318-322, 2007.
- MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2013. Exportação. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/exportacao>
- MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2009. Plano de contingência para influenza aviária e doença de Newcastle. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/>
- Marks, F.S. & Canal, C.W. Etiologia e diagnóstico da infecção causada pelo vírus da influenza (novo vírus e vírus da gripe estacional humana) em suínos. **Acta Sci. Vet.**, v.38(supl 1), p.s37-s43, 2010.
- Marquetoux, N.; Paul, M.; Wongnarkpet, S.; Poolkhet, C.; Thanapongtharm, W.; Roger, F.; Ducrot, C.; Chalvet-Monfray, K. Estimating spatial and temporal variations of the reproduction number for highly pathogenic avian influenza H5N1 epidemic in Thailand. **Prev Vet Med.**, v.106(2), p.143-51, 2012.
- Massad, E.; Coutinho, F. A. B.; Burattini, M. N.; Amaku, M. Estimation of R_0 from the initial phase of an outbreak of a vector-borne infection. **Trop. Med. Int. Health**, v.15, p.120-126, 2010.
- Matrosovich, M. N.; Krauss, S.; Webster, R. G. H9N2 influenza A viruses from poultry in Asia have human virus-like receptor specificity. **Virology**, v.28, p.156-162, 2001.
- Matrosovich, M.; Stech, J.; Klenk, H.D. Influenza receptors, polymerase and host range. **Rev. Sci. Tech.**, v.28, p.203-217, 2009.
- Max, V.; Herrera, J.; Moreira, R.; Rojas, H. Avian influenza in Chile: a successful experience. **Avian Dis.**, v.51, p.363-365, 2007.

- McBride, M.D.; Hird, D.W.; Carpenter, T.E.; Snipes, K.P.; Danaye-Elmi, C.; Utterback, W.W. Health survey of backyard poultry and other avian species located within one mile of commercial California meat-turkey flocks. **Avian Dis.**, v.35, p.403-407, 1991.
- McMartin, D. A.; Khan, M. I.; Farver, T. B.; Christie, G. Delineation of the lateral spread of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. **Avian Dis.**, v.31, p.814-819, 1987.
- Meng, B.; Marriott, A. C.; Dimmock, N. J. The receptor preference of influenza viruses. **Influenza Other Respi. Viruses**, v.4, p.147-153, 2010.
- Mete, A.; Giannitti, F.; Barr, B.; Woods, L.; Anderson, M. Causes of mortality in backyard chickens in Northern California: 2007-2011. **Avian Dis.**, v.57(2), p.311-315, 2013.
- Molia, S.; Samaké, K.; Diarra, A.; Sidibé, M.S.; Doumbia, L.; Camara, S.; Kanté, S.; Kamissoko, B.; Diakité, A.; Gil, P.; Hammoumi, S.; de Almeida, R.S.; Albina, E.; Grosboisa, V. Avian influenza and Newcastle disease in three risk areas for H5N1 highly pathogenic avian influenza in Mali, 2007-2008. **Avian Dis.**, v.55, p.650-658, 2011.
- Nascimento, E. R. & Almeida, V. L. A. Micoplasmoses. In: Berchieri Jr, A.; Silva, E. N.; di Fábio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. **Doença das aves**, FACTA, Campinas, p. 485-496, 2009.
- Nascimento, I. L. S. **As aves do Parque Nacional da lagoa do Peixe**. IBAMA/CEMAVE, Brasília, 1995, 41p.
- Nascimento, J. L. X. & Santos, P.J.P. Preparação pré-migratória de *Sterna hirundo* (Charadriiformes, Sternidae) no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Ornitol.**, v.18, p.307-314, 2010.
- Nascimento, J. L. X. Parque Nacional da Lagoa do Peixe. In: Valente, R. M.; Silva, J. M. C.; Straube, F. C.; Nascimento, J. L. X. **Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil**, 1 ed., Belém: Conservação Internacional, p.321-324, 2011.
- Nazir, J.; Haumacher, R.; Ike, A. C.; Marschang, R. E. Persistence of avian influenza viruses in lake sediment, duck feces, and duck meat. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.77, p.4981-4985, 2011.
- Noormohammadi, A. H. Role of phenotypic diversity in pathogenesis of avian mycoplasmosis. **Avian Pathol.**, v.36, p.439-444, 2007.

- OIE, Office International des Epizooties, 2008. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em <http://www.oie.int>
- OIE, Office International des Epizooties, 2009a. Avian Influenza. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em <http://www.oie.int>
- OIE, Office International des Epizooties, 2009b. Newcastle Disease. In: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Disponível em <http://www.oie.int>
- Oliveira, J. G.; Belluci, M. S. P.; Vianna, J. S. M. Serological survey on influenza virus in domestic and wild birds from Rio do Janeiro State, Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.53, p.299-302, 2001.
- Orsi, M. A. Caracterização biológica, molecular, imunológica e estabilidade térmica das estirpes vacinais e de isolados da doença de Newcastle de aves de produção industrial e migratórias no Brasil. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2010.
- Orsi, M.A.; Doretto Jr, L.; Camillo, S.C.A.; Reischak, D.; Ribeiro, S.A.M.; Ramazzoti, A.; Mendonça, A.O.; Spilki, F.R.; Buzinaro, M.G.; Arns, C.W. Prevalence of Newcastle Disease Virus in broiler chickens (*Gallus gallus*) in Brazil. **Braz J. Microbiol.**, v.41(2), p.349-357, 2010a.
- Orsi, M.A.; Doretto, L. Jr., Camillo, S.C.; Reischak, D.; Ribeiro, S.A.; Ramazzoti, A.; Mendonça, A.O.; Spilki, F.R.; Buzinaro, M.G.; Ferreira, H.L.; Arns, C.W. A survey for maintenance of virulent Newcastle disease virus-free area in poultry production in Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v.41, p.368–375. 2010b.
- Ossada, R. Modelagem da dinâmica de doenças infecciosas em redes de movimentação de animais. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo (USP), 2011. 43p.
- Ossada, R.; Grisi-Filho, J. H.; Ferreira, F.; Amaku, M. Modeling the dynamics of infectious diseases in different scale-free networks with the same degree distribution. **Adv. Studies Theor. Phys.**, v.7(16), p.759 – 771, 2013.
- Palese, P.; Shaw, M. L. *Orthomyxoviridae*: the viruses and their replication. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. **Fields Virology**, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1647–1689, 2007.

- Pantin-Jackwood, M.J.; Miller, P.J.; Spackman, E.; Swayne, D.E.; Susta, L.; Costa-Hurtado, M.; Suarez, D.L. Role of poultry in spread of novel H7N9 influenza virus in China. **J. Virol.**, *in press*.
- Patyk, K.A.; Helm, J.; Martin, M.K.; Forde-Folle, K.N.; Olea-Popelka, F.J.; Hokanson, J.E.; Fingerlin, T.; Reeves, A. An epidemiologic simulation model of the spread and control of highly pathogenic avian influenza (H5N1) among commercial and backyard poultry flocks in South Carolina, United States. **Prev. Vet. Med.**, v.110(3-4), p.510-24, 2013.
- Paul, M.; Wongnarkpet, S.; Gasqui, P.; Poolkhet, C.; Thongratsakul, S.; Ducrot, C.; Roger, F. Risk factors for highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 infection in backyard chicken farms, Thailand. **Acta Trop.**, v.118, p.209-216, 2011.
- Paulillo, A. C. & Doretto Jr, L. Doença de Newcastle. In: Berchieri Jr, A.; Silva, E. N.; di Fábio, J.; Sesti, L.; Zuanaze, M. A. F. **Doença das aves**, FACTA, Campinas, p.587-603, 2009.
- Penny, M. A.; Saurina, J.; Keller, I.; Jenni, L.; Bauer, H. G.; Fiedler, W.; Zinsstag, J. Transmission dynamics of highly pathogenic avian influenza at Lake Constance (Europe) during the outbreak of winter 2005-2006. **Ecohealth**, v.7, p.275-282, 2010.
- Pereda, A. J.; Uhart, M.; Perez, A. A.; Zaccagnini, M. E.; La Sala, L.; Decarre, J.; Goijman, A.; Solari, L.; Suarez, R.; Craig, M. I.; Vagnozzi, A.; Rimondi, A.; König, G.; Terrera, M. V.; Kaloghlian, A.; Song, H.; Sorrell, E. M.; Perez, D. R. Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in SouthAmerica. **Virology**, v.378, p.363-370, 2008.
- Petric, M.; Comanor, L.; Petti, C. A. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. **J. Infect. Dis.**, v.194, p.S98-S110, 2006.
- Poddar, S. K. Influenza virus types and subtypes detection by single step single tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and agarose gel electrophoresis. **J. Virol. Methods**, v.99, p.63-70, 2002.
- Poetri, O.N.; Bouma, A.; Murtinia, S.; Claassen, I.; Koch, G.; Soejoedono, R.D.; Stegeman, J.A.; van Boven, M. An inactivated H5N2 vaccine reduces transmission of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus among native chickens. **Vaccine**, v.27, p.2864-2869, 2009.
- Poolkhet, C.; Chairatanayuth, P.; Thongratsakul, S.; Kasemsuwan, S.; Rukkwamsuk, T. Social network analysis used to assess the relationship between the spread of avian

- influenza and movement patterns of backyard chickens in Ratchaburi, Thailand. **Res. Vet. Sci.**, v. 95(1), p.82-86, 2013a
- Poolkhet, C.; Chairatanayuth, P.; Thongratsakul, S.; Yatbantoong, N.; Kasemsuwan, S.; Damchoey, D.; Rukkwamsuk, T. Social network analysis for assessment of avian influenza spread and trading patterns of backyard chickens in Nakhon Pathom, Suphan Buri and Ratchaburi, Thailand. **Zoonoses Public Health**, v.60(6), p.448-55, 2013b.
- Pospisil, Z.; Zendulkova, D.; Smid, B. Unexpected emergence of Newcastle disease virus in very young chicks. **Acta Vet. Brno.**, v.60, p.263-270, 1991.
- Ramsar, Convention on Wetlands of International Importance, 2014. **The List of Wetlands of International Importance**. Disponível em <http://www.ramsar.org/>
- Razin, S.; Yogevev, D.; Naot, Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v.62, p.1094-1156, 1998.
- RBMA, Reserva da Biosfera da Mata Atlântica, 2014. Disponível em http://www.rbma.org.br/default_02.asp
- Reperant, L.A.; van de Bildt, M.W.; van Amerongen, G.; Buehler, D.M.; Osterhaus, A.D.; Jenni-Eiermann, S.; Piersma, T.; Kuiken, T. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infection in a long-distance migrant shorebird under migratory and non-migratory states. **PLoS One**, v.6(11), e27814, 2011.
- Resende, L.; Leeuwenberg, F. **Ecological studies of Lagoa do Peixe**. Supplement report World Wildlife Fund, Washington, D.C., 1987, 52p.
- Rimondi, A.; Xu, K.; Craig, M. I.; Shao, H.; Ferreyra, H.; Rago, M. V.; Romano, M.; Uhart, M.; Sutton, T.; Ferrero, A.; Perez, D. R.; Pereda, A. Phylogenetic analysis of H6 influenza viruses isolated from rosy-billed pochards (*Netta peposaca*) in Argentina reveals the presence of different HA gene clusters. **J. Virol.**, v.85, p.13354-13362, 2011.
- Rojas, H.; Moreira, R.; Capua, I.; Marangon, S. Avian influenza in poultry in Chile. **Vet. Rec.**, v.151, p.188, 2002.
- Roy, P.; Venugopalan, A. T. Unexpected Newcastle disease virus in day old commercial chicks and breeder hen. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.28, p.277-285, 2005.
- Russell, P. H. Newcastle disease virus: virus replication in the Harderian gland stimulates lacrimal IgA; the yolk sac provides early lacrimal IgG. **Vet. Immun. Immunopath.**, v.37, p.151-163, 1993.

- Russell, P. H.; Ezeifka, G. O. The Hitchner B1 strain of Newcastle disease virus induces high levels of IgA, IgG and IgM in newly hatched chicks. **Vaccine**, v.13, p.61-66, 1995.
- Sato, S. Avian mycoplasmosis in Asia. **Rev. Sci. Tech.**, v.15, p.1555-1567, 1996.
- SAVE, Sociedade para a Conservação das Aves do Brasil, 2014. Disponível em <http://savebrasil.org.br/wp/>
- Savill, N.J.; St Rose, S.G.; Woolhouse, M.E. Detection of mortality clusters associated with highly pathogenic avian influenza in poultry: a theoretical analysis. **J. R. Soc. Interface**, v.5, p.1409-1419, 2008.
- Schelling, E.; Thur, B.; Griot, C.; Audige, L. Epidemiological study of Newcastle disease in backyard poultry and wild bird populations in Switzerland. **Avian Pathol.**, v. 28, p. 263–272, 1999.
- Scherer, A. L.; Scherer, J. F. M.; Petry, M. V.; Sander, M. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in southern Brazil. **Rev. Bras. Ornitol.**, v.19, p.74-79, 2011.
- Schweiger, B.; Zadow, I.; Heckler, R.; Timm, H.; Pauli, G. Application of a fluorogenic PCR assay for typing and subtyping of influenza viruses in respiratory samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.1552–1558, 2000.
- Seal, B. S.; King, D. J.; Sellers, H. S. The avian response to Newcastle disease virus. **Dev. Comp. Immunol.**, v.24, p.257-268, 2000.
- Senne, D. A. Avian influenza in North and South America, 2002-2005. **Avian Dis.**, v.51, p.167-173, 2007.
- Senne, D. A. Avian influenza in North and South America, the Caribbean, and Australia, 2006-2008. **Avian Dis.**, v.54, p.179-186, 2010.
- Shafer, A. L.; Katz, J. B.; Eernisse, K. A. Development and validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Type A influenza antibodies in avian sera. **Avian Dis.**, v.42, p.28–34, 1998.
- Shengqing, Y.; Kishida, N.; Ito, H.; Kida, H.; Otsuki, K.; Kawaoka, Y.; Itom T. Generation of velogenic Newcastle disease viruses from a nonpathogenic waterfowl isolate by passaging in chickens. **Virology**, v.301, p.206-211, 2002.
- Sheta, B.M.; Fuller, T.L.; Larison, B.; Njabo, K.Y.; Ahmed, A.S.; Harrigan, R.; Chasar, A.; Abdel Aziz, S.; Khidr, A.A.; Elbokl, M.M.; Habbak, L.Z.; Smith, T.B. Putative human and avian risk factors for avian influenza virus infections in backyard poultry in Egypt. **Vet. Microbiol.**, v.168(1), p.208-13, 2014.

- Shim, J. B.; So, H. H.; Won, H. K.; Mo, I. P. Characterization of avian paramyxovirus type 1 from migratory wild birds in chickens. **Avian Pathol.**, v.40, p.565-572, 2011.
- Shin, H.J.; Njenga, M.K.; McComb, B.; Halvorson, D.A.; Nagaraja, K.V. Avian pneumovirus (APV) RNA from wild and sentinel birds in the United States has genetic homology with RNA from APV isolates from domestic turkeys. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38(11), p.4282-4, 2000.
- Shinya, K.; Ebina, M.; Yamada, S.; Ono, M.; Kasai, N.; Kawaoka, Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. **Nature**, v.440, p.435-436, 2006.
- Sick, H. **Migrações de aves na América do Sul Continental**. Instituto Brasileiro de Defesa Florestal – IBDF, Publicação Técnica nº. 2, CEMAVE, 1983, 86p.
- Sick, H. **Ornitologia Brasileira**. Rio de Janeiro, Ed. Nova Fronteira, 1997, 912p.
- Smith, G. & Dunipace, S. How backyard poultry flocks influence the effort required to curtail avian influenza epidemics in commercial poultry flocks. **Epidemics**, v.3, p.71-75, 2011.
- Soares, P. B.; Demétrio, C.; Sanfilippo, L.; Kawanoto, A. H.; Brentano, L.; Durigon, E. L. Standardization of a duplex RT-PCR for the detection of Influenza A and Newcastle disease viruses in migratory birds. **J. Virol. Methods**, v.123, p.125-130, 2005.
- Soos, C.; Padilla, L.; Iglesias, A.; Gottdenker, N.; Bédon, M. C.; Rios, A.; Parker, P. G. Comparison of pathogens in broiler and backyard chickens on the Galapagos Islands: implications for transmission to wildlife. **Auk**, v.125(2), p.445-455, 2008.
- Sousa, E.; Costa, T. P.; Werther, K.; Durigon, E. L.; de Araujo, J.; Ferreira, C. S.; Pinto, A. A. Presence of antibodies against H5, H7 and H9 influenza A virus in wild birds in the State of São Paulo, Brazil. **Braz. J. Poultry Sci.**, v.15(3), p.169-172, 2013.
- Spackman, E.; McCracken, K. G.; Winker, K.; Swayne, D. E. An avian influenza virus from waterfowl in South America contains genes from North American avian and equine lineages. **Avian Dis.**, v.51, p.273-274, 2007.
- Spackman, E.; McCracken, K. G.; Winker, K.; Swayne, D. E. H7N3 avian influenza virus found in a South American wild duck is related to the Chilean 2002 poultry outbreak, contains genes from equine and North American wild bird lineages, and is adapted to domestic turkeys. **J. Virol.**, v.80, p.7760-7764, 2006.

- Spackman, E.; Senne, D. A.; Bulaga, L. L.; Myers, T. J.; Perdue, M. L.; Garber, L. P.; Lohman, K.; Daum, L. T.; Suarez, D. L. Development of Real-Time RT-PCR for the Detection of Avian Influenza Virus. **Avian Dis.**, v.47, p.1079–1082, 2003.
- Spackman, E.; Senne, D. A.; Myers, T. J.; Bulaga, L. L.; Garber, L. P.; Perdue, M. L.; Lohman, K.; Daum, L. T.; Suarez, D. L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, p.3256-3260, 2002.
- Spekreijse, D.; Bouma, A.; Stegeman, J. A.; Koch, G.; de Jong, M. C. The effect of inoculation dose of a highly pathogenic avian influenza virus strain H5N1 on the infectiousness of chickens. **Vet. Microbiol.**, v.147, p.59-66, 2011.
- Sprygin, A. V.; Andreychuk, D. B.; Kolotilov, A. N.; Volkov, M. S.; Runina, I. A.; Mudrak, N. S.; Borisov, A. V.; Irza, V. N.; Drygin, V. V.; Perevozchikova, N. A. Development of a duplex real-time TaqMan PCR assay with an internal control for the detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in clinical samples from commercial and backyard poultry. **Avian Pathol.**, v.39, p.99-109, 2010.
- Stallknecht, D. E. & Brown, J. D. Tenacity of avian influenza viruses. **Rev. Sci. Technol.**, v.28, p.59-67, 2009.
- Starick, E.; Romer-Oberdorfer, A.; Werner, O. Type- and subtype-specific RT-PCR assays for avian influenza viruses. **J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health**, v.47, p.295–301, 2000.
- Stegeman, A.; Bouma, A.; de Jong, M. C. Epidemiological models to assist the management of highly pathogenic avian influenza. **Rev. Sci. Tech.**, v.30, p.571-579, 2011.
- Stegeman, A.; Bouma, A.; de Jong, M. C. Use of epidemiologic models in the control of highly pathogenic avian influenza. **Avian Dis.**, v.54, p.707-712, 2010.
- Stegeman, A.; Bouma, A.; Elbers, A.R.W.; de Jong, M.C.M.; Nodelijk, G.; de Klerk, F.; Koch, G.; van Boven, M. Avian influenza A virus (H7N7) epidemic in the Netherlands in 2003: course of the epidemic and effectiveness of control measures. **J. Infect. Dis.**, v.190, p.2088-2095, 2004.
- Stipkovits, L.; Kempf, I. Mycoplasmoses in poultry. **Rev. Sci. Technol.**, v.15, p.1495-1525, 1996.
- Suarez, D. L.; Senne, D. A.; Banks, J.; Brown, I. H.; Essen, S. C.; Lee, C. W.; Manvell, R. J.; Mathieu-Benson, C.; Moreno, V.; Pedersen, J. C.; Panigrahy, B.; Rojas, H.; Spackman,

- E.; Alexander, D. J. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. **Emerg. Infect. Dis.**, v.10, p.693-699, 2004.
- Sultana, R.; Rimi, N. A.; Azad, S.; Islam, M. S.; Khan, M. S.; Gurley, E. S.; Nahar, N.; Luby, S. P. Bangladeshi backyard poultry raisers perceptions and practices related to zoonotic transmission of avian influenza. **J. Infect. Dev. Countries**, v.6, p.156-165, 2012.
- Swayne, D. E.; Halvorson, D. A. Influenza. In: Saif, Y. M.; Barnes, H. J.; Glisson, J. R. Fadly, A. M.; McDougald, L. R.; Swayne, D. E. **Diseases of poultry**, 11th ed. Iowa State University Press, Ames, IA., p.135–179, 2003.
- Swayne, D. E.; Senne, D. A.; Beard, C. W. Influenza. In: Swayne, D. E.; Glisson, J. R.; Jackwood, M. W.; Pearson, J. E.; Reed, W. M. **Isolation and Identification of Avian Pathogens**, 14th ed., American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA, p.150–155, 1998.
- Swayne, D.E. Vaccines for list A poultry diseases; emphasis on avian influenza. **Dev. Biol. (Basel)**, v.114, p.201-212, 2003.
- Takakuwa, H.; Ito, T.; Takada, A.; Okazaki, K.; Kida, H. Potentially virulent Newcastle disease viruses are maintained in migratory waterfowl populations. **Jpn. J. Vet. Res.**, v.45, p.207–215, 1998.
- Terregino, C. & Capua, I. Conventional Diagnosis of Avian Influenza. In: Capua, I; Alexander, D. J. **Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual**, Springer-Verlag, Itália, p.73-86, 2009.
- Terregino, C.; Nardi, R.; Guberti, V.; Scremin, M.; Raffini, E.; Martin, A. M.; Cattoli, G.; Bonfanti, L.; Capua, I. Active surveillance for avian influenza viruses in wild birds and backyard flocks in Northern Italy during 2004 to 2006. **Avian Pathol.**, v.36, p.337-344, 2007.
- Thekiso, M.M.; Mbatia, P.A.; Bisschop, S.P. Diseases of free-ranging chickens in the Qwa-Qwa District of the northeastern Free State province of South Africa. **J. S. Afr. Vet. Assoc.**, v.74, p.14-16, 2003.
- Thomazelli, L. M.; Araujo, J.; Ferreira, C. S.; Hurtado, R.; Oliveira, D. B.; Ometto, T.; Golono, M.; Sanfilippo, L.; Demetrio, C.; Figueiredo, M. L.; Durigon, E. L. Molecular surveillance of the Newcastle disease virus in domestic and wild birds on the north eastern coast and Amazon biome of Brazil. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, v.14(1), p.1–7. 2012.

- Thrusfield, M. **Epidemiologia veterinária**. 2 ed., Roca, São Paulo, 2004, 556p.
- Tiensin, T.; Chaitaweesub, P.; Songserm, T.; Chaisingh, A.; Hoonsuwan, W.; Buranathai, C.; Parakamawongsa, T.; Premashthira, S.; Amonsin, A.; Gilbert, M.; Nielen, M.; Stegeman, A. Highly pathogenic avian influenza H5N1, Thailand, 2004. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, p.1664-1672, 2005.
- Tiensin, T.; Nielen, M.; Vernooij, H.; Songserm, T.; Kalpravidh, W.; Chotiprasatintara, S.; Chaisingh, A.; Wongkasemjit, S.; Chanachai, K.; Thanapongtham, T.; Srisuvan, T.; Stegeman, A. Transmission of the highly pathogenic avian influenza virus H5N1 within flocks during the 2004 epidemic in Thailand. **J. Infect. Dis.**, v.196, p.1679-1684, 2007.
- Tong, S.; Li, Y.; Rivailler, P.; Conrardy, C.; Castillo, D. A.; Chen, L. M.; Recuenco, S.; Ellison, J. A.; Davis, C. T.; York, I. A.; Turmelle, A. S.; Moran, D.; Rogers, S.; Shi, M.; Tao, Y.; Weil, M. R.; Tang, K.; Rowe, L. A.; Sammons, S.; Xu, X.; Frace, M.; Lindblade, K. A.; Cox, N. J.; Anderson, L. J.; Rupprecht, C. E.; Donis, R. O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, p. 4269-74, 2012.
- Tong, S.; Zhu, X.; Li, Y.; Shi, M.; Zhang, J.; Bourgeois, M.; Yang, H.; Chen, X.; Recuenco, S.; Gomez, J.; Chen, L. M.; Johnson, A.; Tao, Y.; Dreyfus, C.; Yu, W.; McBride, R.; Carney, P. J.; Gilbert, A. T.; Chang, J.; Guo, Z.; Davis, C. T.; Paulson, J. C.; Stevens, J.; Rupprecht, C. E.; Holmes, E. C.; Wilson, I. A.; Donis, R. O. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS Pathog.**, v. 9, e1003657, 2013.
- Toyoda, T.; Sakaguchi, T.; Imai, K.; Inocencio, N.M.; Gotoh, B.; Hamaguchi, M.; Nagai, Y. Structural comparison of the cleavage-activation site of the fusion glycoprotein between virulent and avirulent strains of Newcastle disease virus. **Virology**, v.158, p.242-247, 1987.
- Tracey, J. P.; Woods, R.; Roshier, D.; West, P.; Saunders, G. R. The role of wild birds in the transmission of avian influenza for Australia: an ecological perspective. **Emu**, v.104(2), p.109-124, 2004.
- UBABEF, União Brasileira de Avicultura, 2013. **Relatório Anual 2012**. Disponível em <http://www.abef.com.br/ubabef/index.php>
- Valente, R. M.; Silva, J. M. C.; Straube, F. C.; Nascimento, J. L. X. **Conservação de Aves Migratórias Neárticas no Brasil**, 1 ed., Belém: Conservação Internacional, 2011, 406p.

- van der Goot, J. A.; de Jong, M.C.M.; Koch, G.; van Boven, M. Comparison of the transmission characteristics of low and high pathogenicity avian influenza A virus(H5N2). **Epidemiol. Infect.**, v.131, p.1003-1013, 2003a.
- van der Goot, J.A.; Koch, G.; de Jong, M.C.M.; van Boven, M. Quantification of the effect of vaccination on transmission of avian influenza (H7N7) in chickens. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.102, p.18141-18146, 2005.
- van der Goot, J.A.; Koch, G.; de Jong, M.C.M.; van Boven, M. Transmission dynamics of low- and high pathogenicity A/Chicken/Pennsylvania/83 avian influenza viruses. **Avian Dis.**, v.47, p.939-941, 2003b.
- van der Goot, J.A.; van Boven, M.; Koch, G.; de Jong, M.C.M. Variable effect of vaccination against highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus on disease and transmission in pheasants and teals. **Vaccine**, v.25, p.8318-8325, 2007.
- van der Goot, J.A.; van Boven, M.; Stegeman, J. A.; van de Water, S.G., de Jong, M.C.M.; Koch, G. Transmission of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in Pekin ducks is significantly reduced by a genetically distant H5N2 vaccine. **Virology**, v.382, p.91-97, 2008.
- van Eck, J. H.; Goren, E. An Ulster 2C strain-derived Newcastle disease vaccine: vaccinal reaction in comparison with other lentogenic Newcastle disease vaccines. **Avian Pathol.**, v.20, p.497-507, 1991.
- van Voris, L. P.; Betts, R. F.; Menegus, M. A.; Murphy, B. R.; Roth, F. K.; Douglas, R. G. Serological diagnosis of influenza A/USSR/77 H1N1 infection: value of ELISA compared to other antibody techniques. **J. Med. Virol.**, v.16, p.315-20, 1985.
- Walker, P.; Cauchemez, S.; Hartemink, N.; Tiensin, T.; Ghani, A. C. Outbreaks of H5N1 in poultry in Thailand: the relative role of poultry production types in sustaining transmission and the impact of active surveillance in control. **J. R. Soc. Interface**, v.9(73), p.1836-45, 2012.
- Wan, X. F.; Wu, X.; Lin, G.; Holton, S. B.; Desmone, R. A.; Shyu, C. R.; Guan, Y.; Emch, M. E. Computational identification of reassortments in avian influenza viruses. **Avian Dis.**, v.51, p.434-439, 2007.
- Wang, Y., Jiang, Z., Jin, Z., Tan, H., Xu, B. Risk factors for infectious diseases in backyard poultry farms in the Poyang Lake area, China. **PLoS One**, v. 8, e67366, 2013.

- Ward, M. P.; Maftai, D. N.; Apostu, C. L.; Suru, A. R. Association between outbreaks of highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 and migratory waterfowl (family Anatidae) populations. **Zoonoses Public Health**, v.56, p.1-9, 2009.
- Ward, M.P.; Maftai, D.; Apostu, C.; Suru, A. Estimation of the basic reproductive number (R_0) forepidemic, highly pathogenic avian influenza subtype H5N1spread. **Epidemiol. Infect.**, v.137, p.219-226, 2008.
- Webster, R. G.; Bean, W. J.; Gorman, O. T.; Chambers, T. M.; Kawaoka, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiol. Rev.**,v.56, p.152-179, 1992.
- WHSRN, Western Hemisphere Shorebird Reserve Network, 2014. Disponível em <http://www.whsrn.org/western-hemisphere-shorebird-reserve-network>
- Wise, M.G.; Suarez, D.L.; Seal, B.S.; Pedersen, J.C.; Senne, D.A.; King, D.J.; Kapczynski, D.; Spackman, E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of Newcastle disease virus RNA in clinical samples. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, p.329-338, 2004.
- Wright, K. E.; Wilson, G. A. R.; Novosad, D.; Dimock, C.; Tan, D.; Weber, J. M. Typing and subtyping of influenza viruses in clinical samples by PCR. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, p.1180–1184, 1995.
- Wright, P. F.; Neumann, G.; Kawaoka, Y. Orthomyxoviruses. In: Knipe, D. M.; Howley, P. M. **Fields Virology**, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p.1691-1740, 2007.
- Xavier, J.; Pascal, D.; Crespo, E.; Schell, H.L.; Trinidad, J.A.; Bueno, D.J. Seroprevalence of *Salmonella* and *Mycoplasma* infection in backyard chickens in the state of Entre Rios in Argentina. **Poultry Sci.**, v.90, p.746-751, 2011.
- Zheng, T.; Adlam, B.; Rawdon, T.G.; Stanislawek, W.L.; Cork, S.C.; Hope, V.; Buddle, B.M.; Grimwood, K.; Baker, M.G.; O'Keefe, J.S.; Huang, Q.S. A cross-sectional survey of influenza A infection and management practices in small rural backyard poultry flocks in New Zealand. **N. Z. Vet. J.**, v.58(2), p74-80, 2010.