

## **Rede Vírus-MCTI - Priorização da Pesquisa da Influenza**

### **Aviária (H5N1)**

A Influenza aviária é uma doença zoonótica causada pelo vírus da influenza A, capaz de causar infecções graves em animais, incluindo seres humanos. Por isso, as organizações internacionais preconizam ações sobre as implicações dessas doenças para a saúde das pessoas e para os sistemas de saúde pública dos países ultrapassando a questão econômica potencialmente causada pelo impacto na produção animal, mas também levando em consideração o potencial pandêmico desse vírus.

No final de 2020, um novo vírus da influenza aviária altamente patogênica (HPAI) (H5N1) do clado 2.3.4.4 b emergiu de um rearranjo na Europa (1). Este vírus tem provocado a atual panzootia causando alta mortalidade em aves (silvestres e domésticas) e mamíferos em todo o mundo desde 2021 (2). A situação atual indica uma grande circulação do vírus em todos os continentes, exceto a Oceania, incluindo no Brasil. (3). Além de milhões de aves silvestres e domésticas afetadas, um dado preocupante é o número de espécies de mamíferos acometidas, tem crescido substancialmente. Na onda atual (2020-2024), o número de espécies de mamíferos acometidas pelo vírus aumentou quase 5x, chegando a 64 espécies em quatro anos, quando comparado com a onda anterior, 2003-2019 (4).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem sido o responsável por coordenar a vigilância do vírus em cooperação com os laboratórios da Rede Previr, uma iniciativa criada pela Rede Vírus-MCTI. Os laboratórios da Rede Vírus são capacitados para realizar a vigilância genômica em diferentes estados do Brasil. Desde a primeira detecção do vírus em maio de 2023, foram notificados 165 focos de animais silvestres, sendo 157 aves e 5 mamíferos silvestres, além de 3 focos em aves de fundo de quintal. Todos os casos em animais silvestres foram identificados em Bioma Costeiro do Brasil, sendo a grande maioria identificada em parceria com o Programa de Monitoramento de Praias (PMP). O PMP está distribuído na extensão do litoral do sul da Bahia ao Sul de Santa Catarina com

profissionais que percorrem as praias todos os dias, aumentando a chance de identificação de animais sintomáticos.

Além dos casos em animais silvestres, três surtos foram identificados em aves domésticas não comerciais nos Estados de Santa Catarina, Espírito Santo e Mato Grosso do Sul. O único caso de identificação do vírus no interior do País (MS) foi identificado pelo Serviço Veterinário Oficial e, infelizmente, não há dados sobre o genoma identificado neste surto para uma melhor compreensão sobre a origem do vírus.

De acordo com o contexto após a identificação do vírus no País, foram priorizadas e apoiadas seis linhas temáticas para as pesquisas para enfrentamento da gripe aviária H5N1, no edital da Chamada CNPq/MCTI Nº 17/2023. São elas:

**Linha Temática 1: Estudos de patogênese do vírus em humanos e animais**

Três projetos foram apoiados: 1) Patogênese de leões marinhos, 2) Patogênese, alvo terapêuticos para plataforma vacinal com nanopartícula lipídica; 3) Infecções in vitro e in vivo com Virus Like Particle (VLP) para identificação de interactoma

**Linha Temática 2: Desenvolvimento de plataformas alternativas ao uso de ovos embrionados para vacinas contra influenza aviária**

Quatro projetos foram apoiados: 1) RNA circular para aplicação vacinal, 2) Clones de células produtoras para maior rendimento de vacinas; 3) Vacinas de ácido nucleico e avaliação em modelo experimental; 4) LNP- mRNA -H5 do vírus influenza

**Linha Temática 3: Desenvolvimentos de ferramentas para estratégias de diferenciação de animais infectados e vacinados (DIVA), caso vacinas sejam adotadas no futuro do País.**

Dois projetos foram apoiados: 1) Testes diagnósticos para vacina virossomal contra o vírus H5N1; 2) Multiplex com Imunossensores Eletroquímicos

**Linha temática 4: Estudos para avaliação da eficácia de vacinas e esquemas terapêuticos com medicamentos antivirais contra influenza aviária em modelos in vivo e in vitro**

Dois projetos foram apoiados: 1) Nucleotídeos/nucleosídeos inovadores 2) Vacinas candidatas contra vírus influenza H5Nx dos clados 2.3.3.4b, 2.3.2.1a e 2.3.2.1c

**Linha temática 5: Ações para a diminuição da dependência externa de insumos para diagnóstico, tratamento e prevenção**

Dois projetos foram apoiados: 1) Ferramentas diagnósticas para garantir a resposta rápida; 2) Teste diagnóstico imunocromatográfico para enfrentamento da gripe aviária H5N1 com anticorpos IgY

**Linha temática 6: Metodologias para depopulação de grandes populações de aves seguindo normas de bem-estar animal**

Um projeto apoiado: 1) Sistema de depopulação de grandes populações de aves criadas livres de gaiola

Em março de 2024, houve a identificação do vírus em animais de produção, que acende um alerta. O vírus HPAI H5N1 clado 2.3.4.4b foi identificado em cabritos e em vacas leiteiras no Texas e após relatos de redução na produção de leite em vários estados. Pouco tempo depois, o vírus foi identificado em vacas de outros oito estados dos EUA. O vírus foi encontrado principalmente no tecido mamário e no leite bovino, além de ter sido identificado em gatos e animais peridomésticos (5). Embora as infecções em bovinos sejam raras, há estudos que indicam a capacidade do vírus de se replicar na glândula mamária, associada a uma redução na produção de leite (6, 7). Estudos experimentais também demonstraram que bezerros bovinos são suscetíveis à infecção e podem transmitir o vírus de forma assintomática (8) e capazes de eliminar o vírus por até 3 semanas sem apresentar alterações nos parâmetros zootécnicos (5). Dados recentes demonstraram que o vírus foi introduzido pelas aves silvestres em um único episódio para as vacas e foi disseminado pelos estados americanos durante a movimentação dos animais

(9). Isso indica que a disseminação do vírus da influenza aviária em hospedeiros incomuns precisa ser cuidadosamente avaliada.

Neste sentido, com o cenário do vírus da influenza aviária mudando rapidamente no mundo, algumas ações complementares são necessárias com o objetivo de ampliar a vigilância da doença, identificar os riscos potenciais para a saúde humana, incluindo o potencial de transmissão dos animais para as pessoas e realizar medidas de saúde pública necessárias para reduzir o risco contínuo de infecção humana. Linhas de pesquisa adicionais devem ser realizadas, como:

### **1 - Avaliação de aspectos estruturais, virológicos e genômico do vírus circulante no Brasil**

Os aspectos virológicos foram explorados na temática 1 da Chamada CNPq/MCTI Nº 17/2023, especialmente com estudos *in vitro* e estudos em animais silvestres e de laboratório. Porém, análises de ultraestrutura e genômicas são importantes para caracterizações dos vírus circulantes. Com estudos adicionais, será possível relacionar eventuais alterações fenotípicas de isolados brasileiros com a diversidade e rearranjos genéticos pelo sequenciamento dos genomas virais. Conforme as recomendações das agências internacionais, os dados de sequências genéticas serão depositados em bancos de dados disponíveis ao público para monitorar a evolução viral e as possíveis vias de transmissão. Além disso seria priorizado também a construção de um banco de vírus, priorizando os vírus circulantes, para distribuição imediata aos laboratórios da Rede Virus, com devida rastreabilidade, dando suporte ao diagnóstico e estudos de vacina e antivirais.

### **2 – Desenvolvimento de estoques vacinais e avaliação de protótipos vacinais e terapias contra o vírus da Influenza.**

A temática 2 visa apoiar alternativas para a produção de vacinas em ovos embrionados de galinha. Os candidatos à vacina pré-pandêmica existentes (CVVs) são coordenados e compartilhados entre a Rede Global de Vigilância e Resposta à Influenza da Organização Mundial de Saúde (OMS) e são produzidas em ovos embrionados de

galinha. No Brasil, o Instituto Butantan, é a referência no Brasil para a produção de vacinas de Influenza. O projeto da Instituição apoiado na temática 4, tem desenvolvido vacinas utilizando os candidatos à vacina pré-pandêmica existentes (CVVs) pertencentes ao clado 2.3.3.4b (A/Astrakhan/3212/2020), que mantêm a reatividade cruzada com o H5N1 HPAI do clado 2.3.4.4b, atualmente em circulação (10), além 2.3.2.1a e 2.3.4., com e sem adjuvantes. Entretanto, alguns vírus recentes coletados na Europa, Estados Unidos e Brasil apresentaram reatividade reduzida com o vírus da vacina candidata A/Astrakhan/3212/2020 e, com base nesses dados e em outros dados genéticos, o foram propostos novos CVVs para os vírus do clado 2.3.4.4b (A/American wigeon/South Carolina/22-000345-001/2021), incluindo os vírus identificados na América do Sul (11).

Da mesma forma, é necessário a avaliação do perfil de resposta a antivirais existentes para garantir que os vírus isolados são ainda suscetíveis. Destacamos ainda que estudos sobre o manejo clínico para o tratamento de pacientes graves podem contribuir para gerar subsídios de gestão pública.

### **3 - Estudos de patogênese viral**

Nas temáticas 1 e 4 da chamada, foram priorizados estudos para o estabelecimento de modelos experimentais, que desempenham um papel vital no avanço de estratégias terapêuticas, como novos medicamentos, e preventivas, como novas vacinas, para combater infecções. Embora esses modelos nem sempre capturem completamente todas as nuances das doenças humanas, muitas vezes conseguem replicar algumas das características clínicas das doenças, permitindo assim o estudo de novas terapias e vacinas. Para o vírus da influenza aviária, os furões, que não existem no país, são os modelos animais utilizados. Desta forma, o país precisa desenvolver novos modelos animais que adequem à sua realidade. Havendo casos, estudos sobre a patogenia do vírus para investigar vias de morte celular e ativação de inflamação em tecidos humanos e amplificação multissegmentos de vírus H5N1 a partir de tecidos humanos (biópsias e post-mortem) são importantes para verificar circulação silenciosa e sequenciar genes internos.

#### **4 - Desenvolvimento de reagentes para detecção de antígeno viral e anticorpos contra o vírus da influenza aviária**

Desenvolvimento de testes para diminuir a dependência de reagentes importados foi priorizado na temática 5 da Chamada CNPq/MCTI Nº 17/2023. A produção de reagentes, como anticorpos monoclonais, policlonais e antígenos de referência também devem ser priorizados. Estes testes com suas validações serão importantes para identificar populações de animais que podem ser eventuais hospedeiras do vírus. Com a grande dimensão territorial do Brasil, o envio de amostras entre diferentes localidades pode demorar até 4 dias úteis. Assim, formar uma rede de laboratórios com apoio das Unidades para identificação rápida de casos suspeitos de espécies não aviárias em diferentes regiões do país.

Implementar testes rápidos para a identificação no local do vírus da influenza como ferramenta de triagem, especialmente em locais remotos também é uma alternativa para agilizar o diagnóstico. Com isso, as primeiras medidas para mitigação do surto podem ser implementadas rapidamente. Amostras positivas devem continuar com o fluxo e serem encaminhadas ao laboratório oficial para posterior confirmação conforme nota Técnica 01/2023- DSA/DAS/MAPA elaborada em conjunto com o MAPA, MCTI, MS, CEMAVE/ICMbio, USP, PANAFTOSA, SBV.

#### **5 - Monitoramento da inserção do vírus da Influenza aviária em populações de animais Silvestres e domésticos no Brasil**

A rede Previr-MCTI, apoiada pelo CNPq-MCTI-RedeVirus, tem realizado a vigilância em animais silvestres. A rede Previr-MCTI analisou mais de 2400 amostras de animais silvestres desde outubro de 2022 nas diferentes regiões do País, quando houve o aumento da vigilância em aves silvestres por causa da possível introdução do vírus no Brasil. Os dados foram compartilhados com o Ministério da Agricultura para demonstração da vigilância do vírus em animais silvestres pelo órgão. Ao todo, a rede identificou 41 animais positivos, incluindo um vírus do subtipo H11N2 em que foi encontrado o rearranjo gênico do gene PB1 dos vírus H5N1 HPAI no Sul do País em

janeiro de 2023. Este achado indicou que o vírus estava circulando na América do Sul e poderia ser introduzido no Brasil. De fato, o vírus foi identificado alguns meses depois em aves silvestres no Espírito Santo (12). A identificação do vírus em leões marinhos também foi realizada pela rede Previr-MCTI em Santa Catarina (13).

Além da continuidade da vigilância em animais silvestres, deve-se incluir a HPAI no diagnóstico diferencial em espécies não aviárias, incluindo gado, suínos, ovinos, caprinos e outras populações de animais de produção criados com alto risco de exposição aos vírus da HPAI. A parceria com os Centros de Triagens de Animais Silvestres (CETAs), Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Zoológicos precisa ser realizada para ampliar a identificação dos animais silvestres. Propriedades para identificação de animais de produção, abrigos e clínicas veterinárias para vigilância em animais de companhia precisam ser incluídos na amostragem. A Rede Remonar-MCTI, também tem trabalhado com a vigilância de águas residuais e superficiais, poderá contribuir com o monitoramento do vírus nas coleções de água já previamente identificadas pela Rede Previr-MCTI. Vale salientar que o apoio financeiro à rede Previr-MCTI e Remonar-MCTI encerram brevemente e esta vigilância genômica precisa ser contínua em diferentes hospedeiros, pois é fundamental para o reconhecimento dos rearranjos genéticos durante a circulação do vírus.

Finalmente, como mencionado anteriormente, a grande diferença entre o cenário do ano anterior e o de 2024 é o aumento da disseminação do vírus em hospedeiros mamíferos, incluindo animais silvestres e domésticos. Por isso, é fundamental que haja a priorização do monitoramento e das estratégias de prevenção de surtos em animais domésticos e silvestres para proteger a saúde pública, o bem-estar dos animais e a biodiversidade. Espera-se com as redes de Universidades e das Instituições de pesquisa possam ser feitos os estudos complementares à aqueles já apoiados pelo MCTI na primeira chamada para o enfrentamento do vírus da Influenza aviária. A disseminação do vírus para diversas espécies de aves e de mamíferos em todos os continentes do mundo, excluindo a Oceania, causa uma preocupação para a comunidade internacional em relação a uma possível pandemia.

## Referências

1. Xie R, Edwards KM, Wille M, Wei X, Wong SS, Zanin M, El-Shesheny R, Ducatez M, Poon LLM, Kayali G, Webby RJ, Dhanasekaran V. 2023. The episodic resurgence of highly pathogenic avian influenza H5 virus. *Nature* 622:810-817.
2. Wille M, Barr IG. 2022. Resurgence of avian influenza virus. *Science* 376:459-460.
3. European Food Safety A, European Centre for Disease P, Control, European Union Reference Laboratory for Avian I, Fusaro A, Gonzales JL, Kuiken T, Mirinaviciute G, Niqueux E, Stahl K, Staubach C, Svartstrom O, Terregino C, Willgert K, Baldinelli F, Delacourt R, Georganas A, Kohnle L. 2024. Avian influenza overview December 2023-March 2024. *EFSA J* 22:e8754.
4. Plaza PI, Gamarra-Toledo V, Eugui JR, Lambertucci SA. 2024. Recent Changes in Patterns of Mammal Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Worldwide. *Emerg Infect Dis* 30:444-452.
5. USDA. 2024. Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) Detections in Livestock. USDA, <https://www.aphis.usda.gov/livestock-poultry-disease/avian/avian-influenza/hpai-detections/livestock>.
6. Mitchell CA, Nordland O, Walker RV. 1958. Myxoviruses And Their Propagation In The Mammary Gland Of Ruminants. *Can J Comp Med Vet Sci* 22:154–156.
7. Crawshaw TR, Brown IH, Essen SC, Young SC. 2008. Significant rising antibody titres to influenza A are associated with an acute reduction in milk yield in cattle. *Vet J* 178:98-102.
8. Kalthoff D, Hoffmann B, Harder T, Durban M, Beer M. 2008. Experimental infection of cattle with highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis* 14:1132-4.
9. Thao-Quyen Nguyen T-Q, Hutter C, Markin A, Thomas M, Lantz K, Killian ML, Janzen GM, Vijendran S, Wagle S, Inderski B, Magstadt DR, Li G, Diel DG, Frye EA, Dimitrov KM, Swinford AK, Thompson AC, Snevik KR, Suarez DL, Spackman E, Lakin SM, Ahola SC, Johnson KR, Baker AL, Robbe-Austerman S, Torchetti MK, Anderson TK. 2024. Emergence and interstate spread of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) in dairy cattle. *BioRxiv* doi:<https://doi.org/10.1101/2024.05.01.591751>.
10. WHO. 2023. Genetic and antigenic characteristics of zoonotic influenza A viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness.
11. OFFLU-FAO-WOAH. 2024. OFFLU summary report from the WHO vaccine composition meeting, February 2024.
12. Araujo AC, Silva LMN, Cho AY, Reppening M, Amgarten D, Moraes AP, Malta F, Miller M, Dorlass EG, Palameta S, Oliveira DB, Araujo J, Arns CW, Durigon EL, Pinho JRR, Lee DH, Ferreira HL. 2024. Incursion of the clade 2.3.4.4B highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in Brazil through South American countries, 2023 *Emerging Infectious Diseases* 30.
13. Araujo AC, Silva LMN, Cho AY, Corrêa TC, Souza GC, Albuquerque AS, Macagnan E, Kolesnikvoas CKM, Meurer R, Vieira JV, Lemos GG, Barreto AS, Dick JL, Groch KR, Castilho PV, Amgarten D, Malta F, Miller M, Dorlass EG,

Palameta S, Lee S-H, Arns, C. W., Durigon EL, Pinho JRR, Lee DH, Ferreira HL. 2024. Mortality in Sea Lions is associated with the introduction of the H5N1 clade 2.3.4.4b virus in Brazil October 2023: Whole genome sequencing and phylogenetic analysis. BMC Veterinary Research Submitted.