



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Yasmin Luisa Neves Lemes Garcia

**Monitoramento de Influenza Aviária em aves da região de São José do Rio
Preto**

São José do Rio Preto
2023

Yasmin Luisa Neves Lemes Garcia

**Monitoramento de Influenza Aviária em aves da região de São José do Rio
Preto**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Capes - Nº 88887.805202/2023-00

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Paula Rahal

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto
2023

G216m

Garcia, Yasmin Luisa Neves Lemes

Monitoramento de Influenza Aviária em aves da região de São José do Rio Preto /

Yasmin Luisa Neves Lemes Garcia. -- São José do Rio Preto, 2023

40 p. : tabs., mapas

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Paula Rahal

Coorientadora: Marília de Freitas Calmon

1. Influenza. 2. Vigilância epidemiológica. 3. Aves. 4. Região de São José do Rio Preto. 5. Gripe aviária. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Yasmin Luisa Neves Lemes Garcia

**Monitoramento de Influenza Aviária em aves da região de São José do Rio
Preto**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas, junto ao Conselho de Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: Capes

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Paula Rahal
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr. Vivaldo Gomes da Costa
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a. Paola Jocelan Scarin Provazzi
IMES/FAFICA – Câmpus de Catanduva

São José do Rio Preto
21 de novembro de 2023

À minha família, minha orientadora e co-orientadora, meus amigos de
laboratório e a CAPES.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos meus pais, minha irmã, meu parceiro, meus amigos de laboratório, minha orientadora Paula Rahal e co-orientadora Marília Calmon, por todo apoio, carinho e orientação na formulação deste trabalho. Também gostaria de agradecer ao IBILCE/UNESP, pelo ensino público de alta qualidade e por toda a trajetória percorrida desde o momento em que iniciei o curso, com momentos bons e difíceis, mas sem dúvidas necessários para meu crescimento pessoal e profissional.

Além disso, também agradeço ao Zoológico Municipal de São José do Rio Preto e toda sua equipe que foram fundamentais na coleta das amostras que foram analisadas no presente projeto, em especial ao Guilherme Guerra Neto, Richard Alegria Cesario, Renan Vieira Lima, Adrien Bessane, Isabela da Silva Burgatti, Camila Sanches Rodrigues, Natasha Fujii Ando, Beatriz Borelli Pereira, Sabrina dos Santos Cunha, Giovana Ferreira Jarro e Leticia Gabrielli Mendes da Silva.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A cachorra Baleia acompanhou-o naquela hora difícil. Repousava junto à trempe, cochilando no calor, à espera de um osso. Provavelmente não o receberia, mas acreditava nos ossos, e o torpor que a embalava era doce. Mexia-se de longe em longe, punha na dona as pupilas negras onde a confiança brilhava. Admitia a existência de um osso graúdo na panela, e ninguém lhe tirava esta certeza, nenhuma inquietação lhe perturbava os desejos moderados. Às vezes recebia pontapés sem motivo. Os pontapés estavam previstos e não dissipavam a imagem do osso”. Graciliano Ramos (1978).

RESUMO

O vírus Influenza A da gripe aviária foi responsável por diversas pandemias e epidemias ao longo dos anos, propagando-se rapidamente, sendo responsável pela morte de diversas espécies aviárias e mamíferos, incluindo o ser humano. Recentemente, houve um aumento do número de surtos e da taxa de mortalidade em espécies aviárias e mamíferos, gerando alerta principalmente nos países da América Latina e Caribe. Posto isto, o controle da doença e mecanismos legais de trocas de informação são importantes para tomadas de decisões, principalmente porque o Brasil é o maior exportador global de frango e a propagação da gripe aviária no país pode causar um grande impacto econômico, assim como um grande risco devido ao potencial zoonótico do vírus. Desta forma, o objetivo do trabalho foi analisar a presença de Influenza A em espécies aviárias da região de São José do Rio Preto – SP. As amostras de swab orofaríngeos/cloacais provenientes das aves que chegam ao Zoológico Municipal foram coletadas para análise. No ambiente laboratorial, as amostras foram extraídas por Trizol visando a obtenção do RNA total da amostra. Posteriormente foi realizada a amplificação por meio de RT-qPCR. No entanto todas as amostras apresentaram resultado negativo para presença do vírus Influenza A.

Palavras-chave: Influenza A. Vigilância epidemiológica. Gripe aviária. São José do Rio Preto.

ABSTRACT

The bird flu Influenza A virus has been responsible for several pandemics and epidemics over the years, spreading rapidly and being responsible for the death of several avian and mammalian species, including humans. Recently, there has been an increase in the number of outbreaks and the mortality rate in avian and mammalian species, generating alerts mainly in Latin American and Caribbean countries. That said, disease control and legal mechanisms for exchanging information are important for decision-making, mainly because Brazil is the largest global exporter of chicken and the spread of avian influenza in the country can cause a major economic impact, as well as a great risk due to the zoonotic potential of the virus. Therefore, the objective of the work was to analyze the presence of Influenza A in avian species in the region of São José do Rio Preto – SP. Oropharyngeal/cloacal swab samples from birds arriving at the Municipal Zoo were collected for analysis. In the laboratory environment, the samples were extracted by Trizol to obtain the total RNA of the sample. Subsequently, amplification was performed using RT-qPCR. However, all samples tested negative for the presence of the Influenza A virus.

Keywords: Influenza A. Epidemiological surveillance. Bird flu. São José do Rio Preto.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Surto de Influenza aviária e principais rotas de voo de aves selvagens nas Américas, até 4 de agosto de 2023.	15
Figura 2 – Foco de IAAP no Brasil, sendo cada foco uma unidade epidemiológica na qual pelo menos um caso do vírus da influenza aviária foi confirmado, até o dia 13 de outubro de 2023.	18
Figura 3. Estrutura do vírus Influenza A.	21
Figura 4 – Áreas Importantes para Aves Migratórias (áreas regulares de rota, pouso, descanso, alimentação e reprodução) no estado de São Paulo	23
Figura 5 – Os locais de coletas das espécies aviárias que foram levadas ao Zoológico municipal de São José do Rio Preto.	30
Gráfico 1 – Porcentagem das amostras que foram negativas para RT-qPCR do controle endógeno Beta-actina.	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Surtos de Influenza aviária segundo o tipo de animal afetado nas regiões das Américas, até a semana 31 de 2023.	16
Tabela 2 – Número de espécies afetadas por Influenza Aviária de Alta Patogenicidade, até dia 13 de outubro de 2023.	17
Tabela 3 – Identificação das aves na região de São José do Rio Preto – SP de maior interesse para Influenza A.	26
Tabela 4 – Iniciador de PCR e sequências de sonda de hidrólise para Influenza A.	29
Tabela 5 - Iniciador de PCR e sequências de sonda de hidrólise para controle endógeno Beta actina.	29
Tabela 6 - A classificação taxonômica das espécies que foram analisadas no presente projeto.	32

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1. 1 PERSPECTIVA HISTÓRICA	13
1. 2 CENÁRIO GLOBAL	14
2 O VÍRUS	19
2. 1 Potencial zoonótico e migrações	21
3 JUSTIFICATIVA	23
4 OBJETIVOS	18
5 METODOLOGIA	24
5. 1 Coleta de amostras das aves	25
5. 2 Extração por Trizol	22
5. 3 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR)	27
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. 1 Coletas de amostras biológicas	29
6. 2 RT-qPCR	30
6. 3 Espécies aviárias	31
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	35
APÊNDICE A – Tabela de quantidade e porcentagem de espécies aviárias por município	39

1 INTRODUÇÃO

1. 1 Perspectiva Histórica

As pandemias e epidemias de Influenza, são identificadas ao longo dos séculos como protagonista de diversos surtos e um grande número de óbitos. Essas perturbações presentes na história, com possíveis episódios datados antes mesmo do isolamento do vírus em laboratório, foram inicialmente identificados pelas características atribuídas a doença. Portanto, diversas pesquisas foram desenvolvidas durante anos sobre os surtos da gripe, promovendo uma perspectiva não completa, mas bem detalhada sobre a propagação, virulência e a capacidade do vírus de infectar novos hospedeiros.

Em 1932, pela primeira vez o vírus Influenza foi isolado em laboratório, abrindo caminho para o diagnóstico laboratorial, com registros e confirmações da presença do vírus. Isso representou um avanço significativo em relação aos séculos anteriores, nos quais a identificação era possível apenas pelos sinais característicos da doença, como febre de três dias, dor muscular e um elevado grau de prostração. No entanto, referências a Influenza podem ser encontradas em publicações mais antigas e menos confiáveis desde 1650 (POTTER, 2001).

Durante o século XX, vários subtipos do vírus influenza foram responsáveis por pandemias, incluindo a “gripe espanhola” (H1N1) em 1918, a “gripe asiática” (H2N2) em 1957 e a “gripe de Hong Kong” (H3N2) em 1968 (BELSHE; ROBERT, 2005; POTTER, 2001). Além de pandemias, algumas epidemias de Influenza ocorrem anualmente nos períodos mais frios e com menor umidade, característico de climas temperados dos hemisférios norte e sul, contrastando aos climas tropicais e subtropicais, onde ocorrem nos meses com maior umidade absoluta e precipitação (ALI et al., 2022; BAUMGARTNER et al., 2012).

No final do século XX e começo do XXI, o vírus Influenza A subtipo H3N2 que circulava entre seres humanos foi notavelmente introduzido na população de porcos em 1998,

cruzando a barreira entre espécies. E cinco anos depois, em 2003, o subtipo H5N1 propagou-se pelo sudeste da Ásia, causando a morte de milhares de aves domésticas e 24 pessoas, mas em 2013, o número de humanos afetados sextuplicou, decorrentes da infecção pelo subtipo H7N9 (TORTORA, FUNKE, & CASE, 2017).

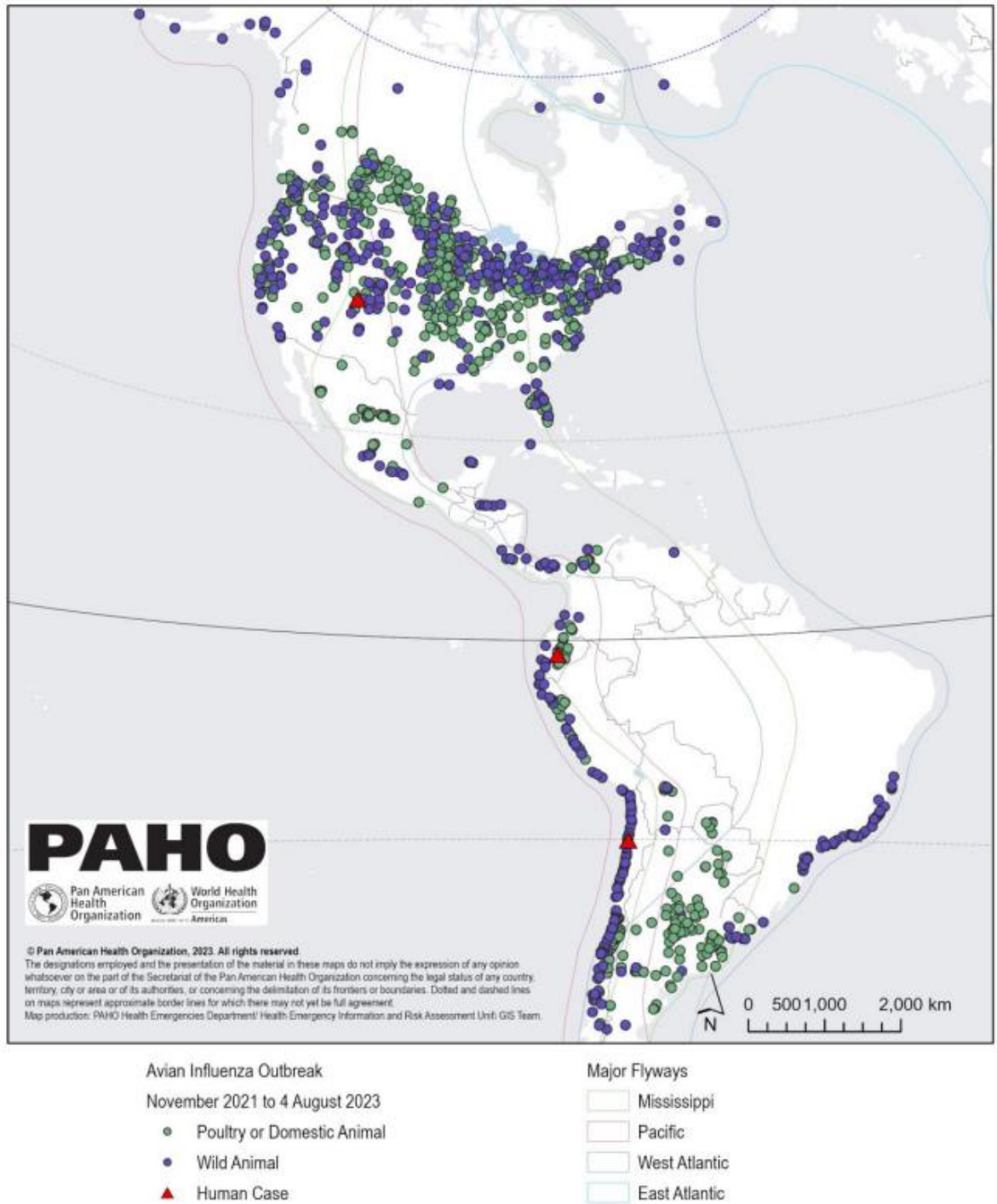
Os estudos sobre as pandemias de Influenza são importantes para que epidemiologistas e médicos, assim como outros pesquisadores, consigam compreender as características da propagação do vírus, sazonalidade, como podem afetar o cenário econômico-social, além de outros índices que ajudam a inferir a morbidade e mortalidade da doença nos cenários atuais (POTTER, 2001).

1. 2 Cenário Global

No começo desse ano, a Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) publicou uma declaração alertando sobre o aumento dos surtos de Influenza A em diversas regiões do mundo, causando um aumento da taxa de mortalidade de aves e outros animais (Figura 1.). Os seres humanos, também podem transmitir a Influenza A. O aumento dos casos de gripe aviária subtipo H5N1, existe a possibilidade do subtipo se adaptar e ser propagado para outros animais, incluindo seres humanos (WOAH, 2023).

Os registros da Organização Mundial de Saúde (WHO), apontam 878 casos confirmados de seres humanos infectados com H5N1, dos quais 458 resultaram em mortes, uma taxa de mortalidade de 52%. No período de 2003 até outubro de 2023, 244 casos, com 136 mortes nos países da região do Pacífico Ocidental, uma taxa de 56% em 11 anos. Em 2023, foram confirmados três casos em seres humanos: dois no Camboja que resultaram em uma morte e um na China (WOAH, 2023).

Figura 1. Surtos de Influenza aviária e principais rotas de voo de aves selvagens nas Américas, até 4 de agosto de 2023.



Fonte: Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) (2023); OPAS/OMS (2023).

As autoridades da agricultura na Argentina, Bolívia, Brasil, Canadá, Chile, Colômbia, Costa Rica, Cuba, Equador, Estados Unidos da América, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Peru, Uruguai e Venezuela detectaram surtos de IAAP (Influenza Aviária Altamente Patogênica) em aves domésticas, aves de granja e/ou aves selvagens e mamíferos (Tabela 1.), com surtos localizados principalmente em áreas da rota migratória do Pacífico.

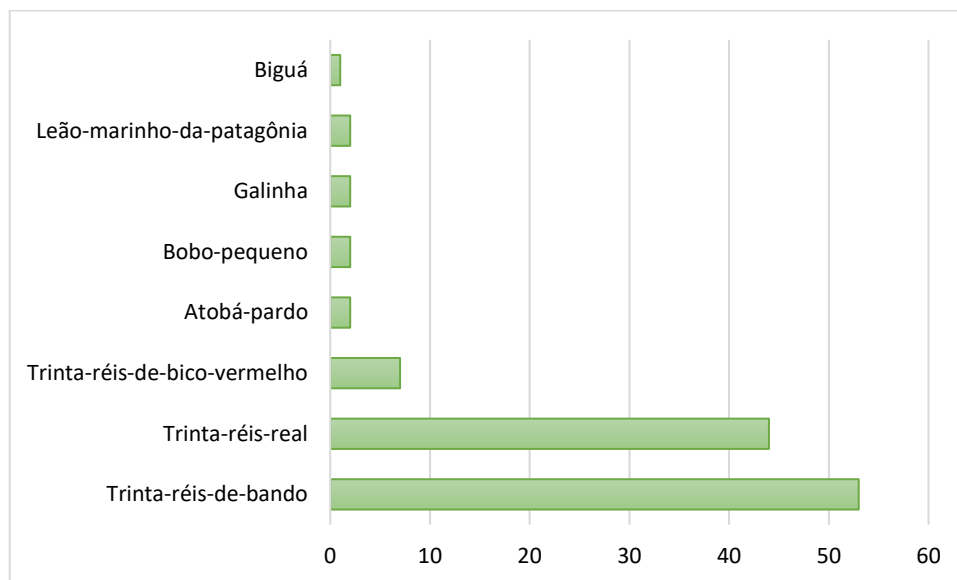
Tabela 1. Surtos de Influenza aviária segundo o tipo de animal afetado nas regiões das Américas, até a semana 31 de 2023.

Países	Aves selvagens	Granja avícola	Aves de quintal	Mamíferos
Argentina	Sim	Sim	Sim	
Bolívia	Sim	Sim	Sim	
Brasil	Sim		Sim	
Canadá	Sim	Sim	Sim	Sim
Chile	Sim	Sim	Sim	Sim
Colômbia	Sim		Sim	
Costa Rica	Sim			
Cuba	Sim			
Equador	Sim	Sim		
Guatemala	Sim			
Honduras	Sim			
México	Sim	Sim		
Panamá	Sim		Sim	
Peru	Sim	Sim	Sim	Sim
Estados Unidos	Sim	Sim	Sim	Sim
Uruguai	Sim		Sim	Sim
Venezuela	Sim			

Fonte: Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) (2023); OPAS/OMS (2023) (adaptado).

No Brasil, o primeiro caso ocorreu em 15 de maio de 2023. O Ministério da Agricultura e Pecuária (Mapa) detectou influenza aviária (H5N1) em duas espécimes de trinta-réis-de-bando (*Thalasseus acutiflavus*) na região litorânea do Espírito Santo nos municípios de Maratáez e Vitória. Um dia depois, o MAPA confirmou um caso adicional na espécie atobá-pardo (*Sula leucogaster*) no mesmo estado (Figura 2.). Desde então, foram identificados 127 focos de IAAP pelo Serviço Veterinário Oficial (Tabela 2.)

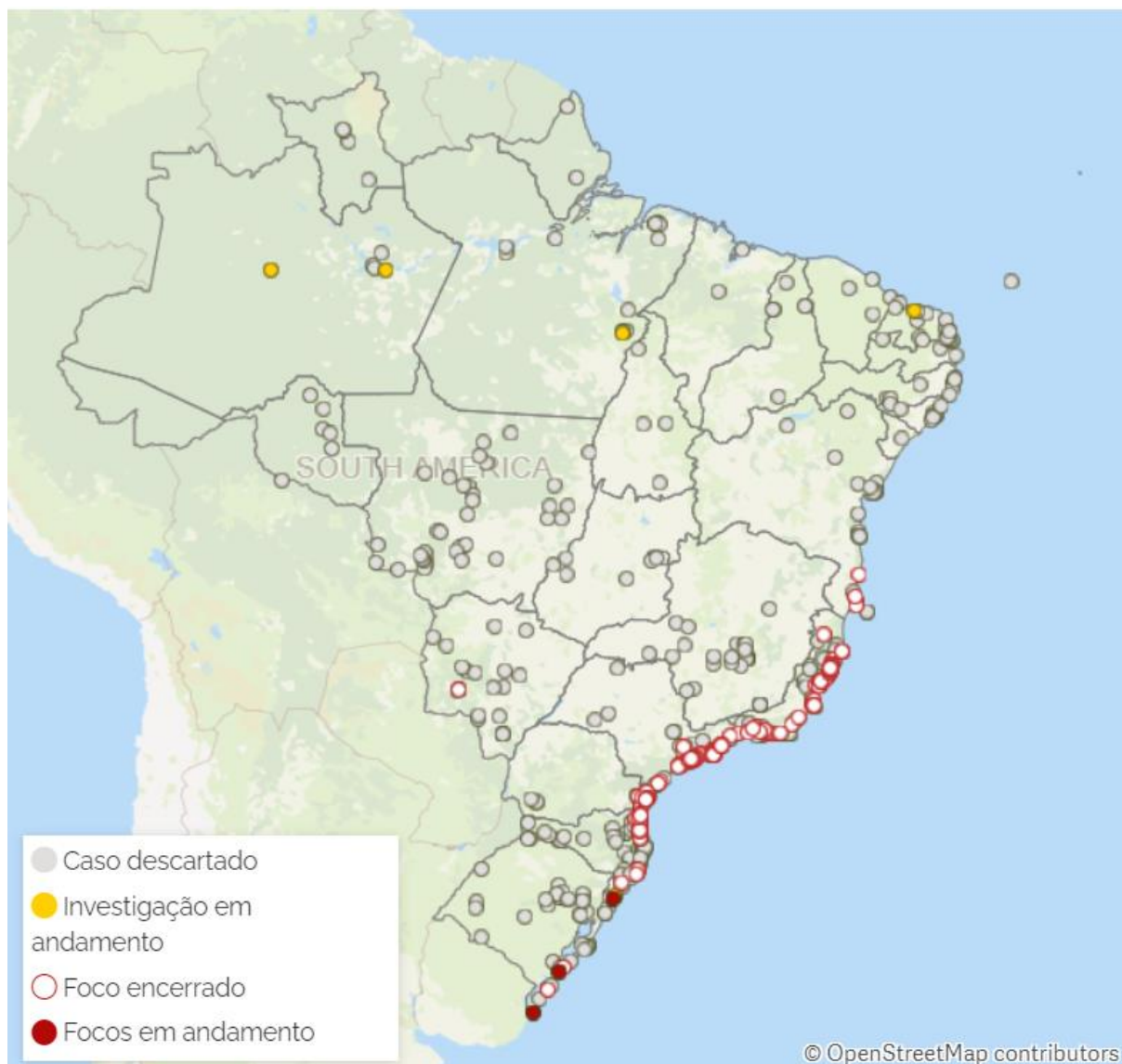
Tabela 2. Número das principais espécies afetadas por Influenza Aviária de Alta Patogenicidade, até dia 13 de outubro de 2023.



Fonte: Mapa, 2023 (adaptado)

Ainda de acordo com os dados da Mapa (MAPA, 2023), no estado de São Paulo, foram registrados 39 focos de IAAP, 18 desses focos envolvendo a espécie Trinta-réis-de-bando (*Thalasseus acutiflavus*), 16 Trinta-réis-real (*Thalasseus maximus*), 2 Bobo-pequeno (*Puffinus puffinus*), 2 Faigão-rola (*Pachyptila desolata*), 1 Garça-branca-pequena (*Egretta thula*) e 1 Trinta-réis-de-bico-vermelho (*Sterna hirundinacea*). Os municípios do estado de São Paulo onde os focos foram detectados são: Itanhaém, Santos, Guarujá, São Sebastião, Ubatuba, Caraguatatuba, Bertioga, Ilha Comprida, Mongaguá, Praia Grande, São Vicente, Ilhabela, Peruíbe e na cidade de São Paulo.

Figura 2. Foco de IAAP no Brasil, sendo cada foco uma unidade epidemiológica na qual pelo menos um caso do vírus da influenza aviária foi confirmado até o dia 13 de outubro de 2023.



Fonte: Mapa, 2023.

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação Saúde Animal (FAO, 2023) mapeou a abrangência do vírus da gripe aviária com potencial zoonótico no mundo, incluindo H5Nx e H7Nx de alta patogenicidade e H3N8, H5Nx, H6N1, H7Nx, H9N2, H10N3, H10N8 e H11 de baixa patogenicidade. Os dados do último ano evidenciaram o crescimento da distribuição do vírus Influenza A (IAV) no mundo, principalmente no continente americano, com o subtipo H5N1 (IAAP) espalhando-se pela América do Sul.

Ademais, os projetos de vigilância dos IAVs foram geralmente conduzidos em áreas rurais e reservas naturais, mas existem relatos do vírus IAAP de aves selvagens em áreas altamente urbanizadas (GRONESOVÁ; MIŽÁKOVÁ; BETÁKOVÁ, 2009; STURM-RAMIREZ et al., 2004). Entretanto, pouca informação é produzida sobre a frequência da AIV em aves selvagens em cidades onde se encontra um maior fluxo de pessoas e os riscos que pode representar para aves domésticas e outras espécies.

Dessa forma, o controle da doença em animais é a primeira medida para diminuir a doença em seres humanos. Por conseguinte, é necessário estabelecer e reforçar mecanismos legais, assim como, a implementação de um programa de vigilância abrangente, para ocorrer trocas de informação e decisões eficientes, com respostas emergenciais a um risco potencial de pandemia ou epidemia (OPAS/OMS, 2023).

2 O VÍRUS.

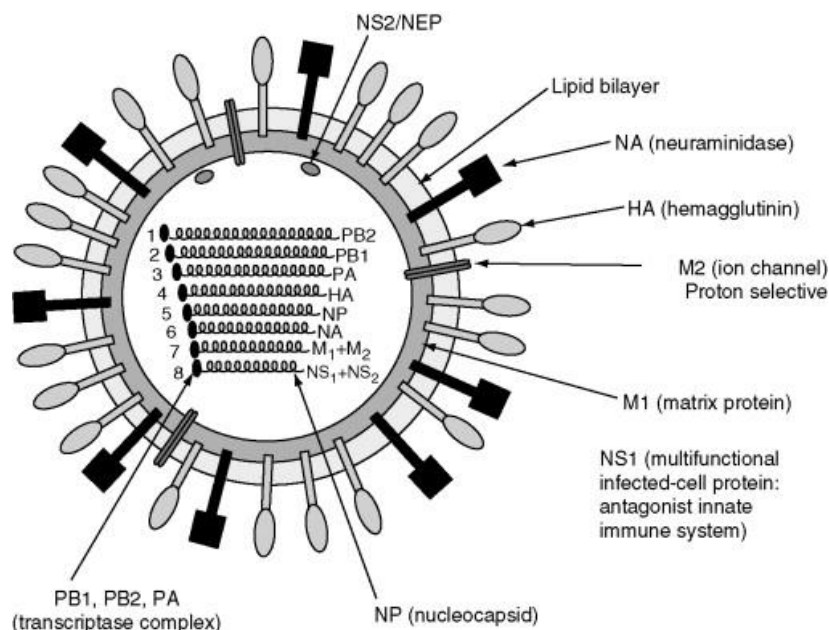
O vírus causador da gripe aviária infecta diversas espécies e é um importante patógeno respiratório humano, responsável por diversas epidemias anuais e ocasionalmente pandemias, sendo relevante e preocupante para saúde pública (MALIK; ZHOU, 2020). O vírus Influenza, denominação de origem italiana de “influence”. Pertencente a família *Orthomyxoviridae*, classificado de acordo com seus antígenos e com base nas variações da nucleoproteína, em quatro gêneros: vírus Influenza A, vírus Influenza B, vírus Influenza C e vírus Influenza D (BROXMEYER, 2006; HAUSE et al., 2014). O IAV, colocado no gênero *Alphainfluenzavirus* (Influenza de tipo A), é um vírus classificado com base nas hemaglutininas (HA) e neuraminidases (NA), glicoproteínas presentes na superfície viral, com cerca de 16 subtipos de HA e 9 subtipos de NA, com novos subtipos sendo propostos (WOAH, 2023).

A glicoproteína HA é um trímero com aspecto de tridente, na qual cada unidade é ativada por uma protease e clivada em subunidades, mantidas juntas por uma ponte dissulfeto, é a proteína de adsorção viral, que se liga ao ácido siálico nos receptores das células epiteliais, promovendo a fusão do envelope viral à membrana celular. A NA forma um tetrâmero e possui atividade enzimática, cliva o ácido siálico em glicoproteínas (MURRAY, 2017).

Dos vários subtipos virais, os três tipos de vírus que conseguem infectar seres humanos e causar doenças são: A, B e C. A Influenza A e B, são vírus envelopados codificados por genomas segmentados de RNA no sentido negativo (UYEKI et al., 2020). Sendo os subtipos AIV H5 ou H7 de alta patogenicidade (IAAP) de ocorrência natural, determinado por uma metodologia que inclui uma sequência de clivagem HA0 (WOAH, 2023).

O genoma viral da IAV contém oito moléculas segmentadas nucleocapsídicas helicoidais diferentes, cada um contendo RNA com polaridade negativa, associado com nucleoproteína e transcriptase, as quais codificam cerca de 20 proteínas e cada seguimento consiste na molécula de RNA viral associada às proteínas polimerases virais (Figura 3.) (EISFELD; NEUMANN; KAWAOKA, 2015; MOSTAFA et al., 2018; MURRAY, 2017). O genoma fragmentado desses vírus facilita o desenvolvimento de novas cepas, consequência da mutação e reagrupamento dos segmentos entre cepas diferentes do vírus (MURRAY, 2017).

Figura 3. Estrutura do vírus Influenza A.



Fonte: LAMB, 2008.

No ciclo viral da IAV, a entrada do vírus nas células epiteliais respiratórias ocorre pela ligação da HA viral ao ácido siálico específico das glicoproteínas da superfície celular. Após a ligação, o vírus é internalizado por uma vesícula e encaminhado ao endossomo. O envelope viral à membrana do endossomo. O nucleocapsídeo liberado no citoplasma, migra para o núcleo para ser transcrito em RNA mensageiro (RNAm). A transcriptase utiliza o RNAm da célula hospedeira como iniciador para síntese do RNAm viral, sendo posteriormente traduzidos em proteínas no citoplasma. Por fim, o genoma viral de RNA com polaridade negativa é replicado no núcleo, formando nucleocapsídeos no citoplasma que brotam da superfície apical da célula após oito horas de infecção (RUST et al., 2009; SCHOLTE et al., 2011; MURRAY, 2017)

2.1 Potencial zoonótico e migrações

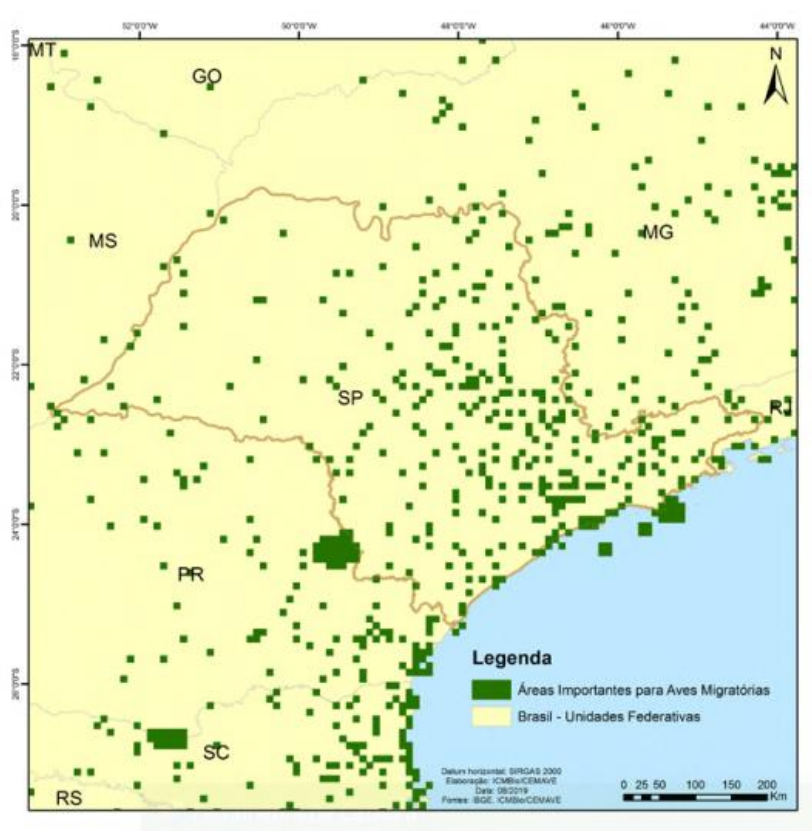
A IAV consegue infectar uma diversidade de aves suscetíveis a infecção, principalmente aves aquáticas que são reservatórios desses vírus, cuja maioria são IABP (Influenza Aviária de

Baixa Patogenicidade). Mas, como dito anteriormente, os subtipos como H5 e H7 que ocorrem amplamente em aves de importância econômica produzem uma doença clínica aguda, existindo um risco com potencial pandêmico de que esses subtipos, apesar de serem de IABP, se tornarem IAAP por mutações. Algumas cepas H5, H7 e H9 causam infecções zoonóticas esporádicas, possibilitando que mutações sejam transmitidas para seres humanos (COX; TROCK; UYEKI, 2016).

As aves aquáticas selvagens são consideradas a fonte inicial dos IAV, por serem frequentemente infectadas com todos os subtipos conhecidos. Sendo a maioria das espécies pertencentes às ordens Anseriformes (patos, gansos e cisnes) e Charadriiformes (aves limícolas e gaivotas) (WEBSTER et al., 1992). Sendo relevante ressaltar que algumas aves migratórias que pertencem a essas ordens citadas, partem do leste do Canadá e Estados Unidos, atravessam o Atlântico alcançando o continente Sul-Americano (ICMBIO, 2020). Chegando ao Brasil, essas aves podem pegar diferentes rotas migratórias, permanecendo no país de maio a setembro. Algumas dessas aves passam pelo interior de São Paulo (Figura 3.) (ICMBIO, 2020).

De acordo com (MOSTAFA et al., 2018) mais de 50% das infecções virais humanas podem ser transmitidas por animais. Dessa forma a saúde animal, humana e ambiental estão inter-relacionadas, principalmente em decorrência da alta diversidade genética e antigênica, e aquisição gradual de alterações particulares e importantes na adaptação a um novo hospedeiro, possibilitando a adaptação a diversos hospedeiros. Um estudo diferente realizado por SOUSA et al. (2013) relatou a presença de anticorpos contra H5, H7 e H9 Influenza A no sangue de 31 aves silvestres do estado de São Paulo, dos quais 27 foram consideradas positivas, indicando uma infecção ou infecções consecutivas com diferentes subtipos.

Figura 4. Áreas Importantes para Aves Migratórias (áreas regulares de rota, pouso, descanso, alimentação e reprodução) no estado de São Paulo.



Fonte: ICMBio, 2020.

O IAV, por se tratar de um vírus com interfaces também ligadas ao ambiente, pode ser detectado em águas residuais, concentrado em sólidos, sendo correlacionadas em vários estudos a presença do RNA do IAV e a taxa de incidência do IAV. A vigilância da gripe nas águas residuais, também ajudam na detecção de diferentes cepas cocirculantes, atuando efetivamente para detectar aumento e quedas durante um surto de Influenza A, com aplicações que auxiliam no monitoramento e vigilância clínica, atuando fora da época típica da gripe (MERCIER et al., 2022; WOLFE et al., 2022)

A Influenza pandêmica é causada por uma mudança antigênica significativa no processo de rearranjo. Caso dois subtipos infectem um mesmo indivíduo a replicação pode causar o

surgimento de uma nova cepa. A nova cepa é originada de segmentos diferentes dos vírus provenientes, na qual pode não haver imunidade da população contra a variante e se a virulência for elevada pode gerar uma pandemia (KORSMAN, 2014).

3 JUSTIFICATIVA

O Brasil é um grande exportador global de carne de frango, posto isto, a propagação da gripe aviária no território nacional acarretaria um grande impacto econômico devido às restrições comerciais (THOMAZELLI et al., 2012). O conhecimento da circulação dos vírus de baixa e alta patogenicidade em aves silvestres pode ser útil para melhorar a vigilância desses vírus, sua propagação, mutações, hospedeiros e possíveis surtos. E muitas aves limícolas migram a longas distâncias, algumas migram da América do Norte, onde se reproduzem para a América do Sul, local onde passam o inverno boreal (PEARCE et al., 2010; RODRIGUES et al., 2009).

As aves limícolas migram do inverno boreal geralmente em setembro por rotas como: Rota Atlântica, Rota Nordeste, Rota do Brasil Central, Rota Amazônica Central/Pantanal e Rota Amazônica Ocidental, (ANTAS, 1983; ICMBIO, 2020) chegando a diversos municípios no interior de São Paulo, incluindo a região de São José do Rio Preto, espécies como o maçarico-pintado (*Actitis macularius*), perna-amarela-pequena (*Tringa flavipes*), maçarico-solitário (*Tringa solitaria*), Talha-mar (*Rynchops niger*).

As migrações dessas aves que são reservatórios naturais do vírus Influenza, caso estejam infectadas, são capazes de transmitir para outras espécies silvestres ou domésticas, assim como mamíferos, aumentando a possibilidade de surto da gripe aviária. O Centro de Controle de Doenças e Prevenção (CDC) registrou até o momento que nos 47 estados dos Estados Unidos da América quase 60 mil aves domésticas foram afetadas pela IAV, e mais de 6 mil aves

selvagens foram detectadas com a infecção em 50 estados, e um caso em ser humano foi registrado no estado do Novo México (CDC, 2023).

4 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo analisar amostras de swabs orofaríngeas e cloacais de espécies aviárias da região de São José do Rio Preto para presença de Influenza A.

Objetivos específicos:

- a. Detectar a presença do genoma viral da Influenza A em amostras de aves na região de São José do Rio Preto – SP por meio da PCR em tempo real.
- b. Realizar a subtipagem da Influenza A caso encontrada por meio do sequenciamento de Sanger.
- c. Pretende-se isolar as amostras positivas para Influenza A em cultura da linhagem MCDK.
- d. Realizar uma análise filogenética dos subtipos de Influenza A encontrados.
- e. Interligar quais espécies de aves apresentaram a infecção viral, associando a espécime a época sazonal e o subtipo da Influenza A.

5 METODOLOGIA

5.1 Coleta de amostras das aves

As amostras de swabs são provenientes do Zoológico Municipal de São José do Rio Preto que é responsável por prestar atendimentos clínicos, assim como abrigar, cuidar e alimentar animais que foram resgatados de maus tratos ou que se encontram irregularmente como animais domésticos, vítimas de tráfico de animais e atropelamentos. Resgatando animais de 90 municípios da região, até que possam ser inseridos novamente ao seu habitat ou destinados a um abrigo (Prefeitura de São José do Rio Preto, 2019a).

No total, foram coletadas diversas espécies de aves, com um maior interesse em filos apresentadas na literatura como mais propensas a infecção por Influenza A: Anseriformes, Suliformes, Gruiformes, Pelecaniformes, Galliformes e Charadriiformes. As amostras serão obtidas por swabs orofaríngeos e cloacais e suspensas em uma solução antibiótica e antifúngica que permite a sobrevivência do vírus, conforme estabelecido no manual terrestre da Organização Mundial de Saúde Animal (MOSHINSKY, 1959). Além disso, foram utilizados registros de avistamentos do site WikiAves e o livro “Ecossistema da Represa Municipal de São José do Rio Preto” da Prof^a Dr^a Lilian Casatti, para estabelecer as filos de maior interesse na região de São José do Rio Preto (Tabela 3.).

Tabela 3. Identificação das aves na região de São José do Rio Preto – SP de maior interesse para Influenza

A.

Filo	Família	Espécie	Nome Comum
Suliformes	Anhingidae	<i>Anhinga anhinga</i>	biguatinga
	Phalacrocoracidae	<i>Nannopterum brasilianum</i>	biguá
Gruiformes	Aramidae	<i>Aramus guarauna</i>	carão
	Rallidae	<i>Aramides cajaneus</i>	saracura-três-potes
		<i>Aramides saracura</i>	saracura-do-mato
		<i>Gallinula galeata</i>	galinha-d'água
		<i>Laterallus exilis</i>	sanã-do-capim
		<i>Laterallus melanophaius</i>	sanã-parda
		<i>Mustelirallus albicollis</i>	sanã-carijó
		<i>Pardirallus maculatus</i>	saracura-carijó
		<i>Pardirallus nigricans</i>	saracura-sanã
		<i>Porphyrio flavirostris</i>	frango-d'água-pequeno
		<i>Porphyrio martinica</i>	frango-d'água-azul
		<i>Rufirallus viridis</i>	sanã-castanha

Pelecaniformes	Ardeidae	<i>Ardea alba</i>	garça-branca-grande
		<i>Ardea cocoi</i>	garça-moura
		<i>Bubulcus ibis</i>	garça-vaqueira
		<i>Butorides striata</i>	socozinho
		<i>Egretta caerulea</i>	garça-azul
		<i>Egretta thula</i>	garça-branca-pequena
		<i>Ixobrychus exilis</i>	socoí-vermelho
		<i>Nycticorax nycticorax</i>	socó-dorminhoco
		<i>Syrigma sibilatrix</i>	maria-faceira
		<i>Tigrisoma lineatum</i>	socó-boi
	Threskiornithidae	<i>Mesembrinibis cayennensis</i>	coró-coró
		<i>Phimosus infuscatus</i>	tapicuru
		<i>Platalea ajaja</i>	colhereiro
		<i>Theristicus caudatus</i>	curicaca
Galliformes	Cracidae	<i>Ortalis remota</i>	aracuã-guarda-faca
		<i>Penelope obscura</i>	jacuguaçu
Charadriiformes	Charadriidae	<i>Vanellus chilensis</i>	quero-quero
	Jacanidae	<i>Jacana jacana</i>	jaçanã
	Laridae	<i>Phaetusa simplex</i>	trinta-réis-grande
		<i>Rynchops niger</i>	talha-mar
		<i>Sternula superciliaris</i>	trinta-réis-pequeno
	Scolopacidae	<i>Actitis macularius</i>	maçarico-pintado
		<i>Gallinago undulata</i>	narcejão
		<i>Tringa flavipes</i>	maçarico-de-perna-amarela
		<i>Tringa solitaria</i>	maçarico-solitário
	Recurvirostridae	<i>Himantopus melanurus</i>	pernilongo-de-costas-brancas

Fonte: CASATTI, 2021.

5.2 Extração por Trizol

As amostras advindas de espécies aviárias, foram inicialmente submetidas a extração pelo método TRIzol® Reagent (Invitrogen®) para obtenção do RNA total, com 250 µL de

amostra e 750 μ L de Trizol®, que logo após sua adição foram homogeneizados por inversão e incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Seguido pela adição de clorofórmio (Merck Millipore®), homogeneização por inversão e incubação por 3 minutos, sendo possível visualizar a separação do DNA e RNA após a centrifugação da amostra à 14.000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Após a centrifugação, observou-se a formação de três fases, o RNA estava na região sobrenadante com tom transparente. A porção onde se encontra o RNA é transferida para outro tubo onde foi adicionado 500 μ L de isopropanol absoluto (Merck Millipore®), realizando novamente a inversão para que a amostra seja homogeneizada e incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. Então, as amostras passaram por uma segunda centrifugação à 4°C e 14.000 rpm durante 20 minutos.

Ao final do processo o líquido todo é descartado, o *pellet* de RNA se encontra aderido ao tubo, onde foram adicionados 1 mL de etanol DEPEC 75% (Merck Millipore®) que também foi centrifugado 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Por fim, todo o líquido foi novamente descartado e o tubo contendo o *pellet* de RNA secado a vácuo, sendo ressuspendido em 30 μ L de água DEPEC (Sigma Aldrich®) ao final da extração e quantificado no espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®).

5. 3 Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR).

O material genético extraído foi evidenciado pela reação de RT-qPCR (Transcrição Reversa seguida da Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real) Quanti Studio, pelo Kit AgPath-ID™ One-Step (Tabela 4). Cada etapa do processo prossegui-o conforme as instruções constantes no protocolo do fabricante, com controles positivos e negativos internos. Além disso, foi utilizado o controle endógeno beta-actina para verificação da integridade da amostra submetida.

Foi desenvolvido um conjunto de iniciadores específicos do gene matriz da Influenza A, juntamente com uma sonda de hidrólise, projetados para regiões conservadas do vírus, conforme detalhado na Tabela 5. e baseado no trabalho de SPACKMAN et al. (2002). Além disso, foram empregados iniciadores utilizados para controle endógeno conforme descrito por Van Borm et al. (2007).

Tabela 4. Iniciador de PCR e sequências de sonda de hidrólise para Influenza A.

Especificidade	Iniciador/sonda	Sequências (5-3)
Vírus da Gripe A	M 25	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
	M 124	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
	M 64	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA

um FAM, 6-carboxifluoresceína; TAMRA, 6-carboxitetrametilrodamina.

Fonte: Traduzido (SPACKMAN et al., 2002).

Tabela 5. Iniciador de PCR e sequências de sonda de hidrólise para controle endógeno Beta actina.

Especificidade	Iniciador/sonda	Sequências (5-3)
Controle endógeno de Beta Actina	b+632	CCT CAT GAA GAT CCT GAC AGA
	b-747	TCT CCT GCT CYA AYT CCA
	B+696	HEX-CGT GAC ATC AAG GAG AAG CTG TG-BHQ

Um HEX, 6-Hexachloro-fluorescein; BHQ, Black Hole Quencher.

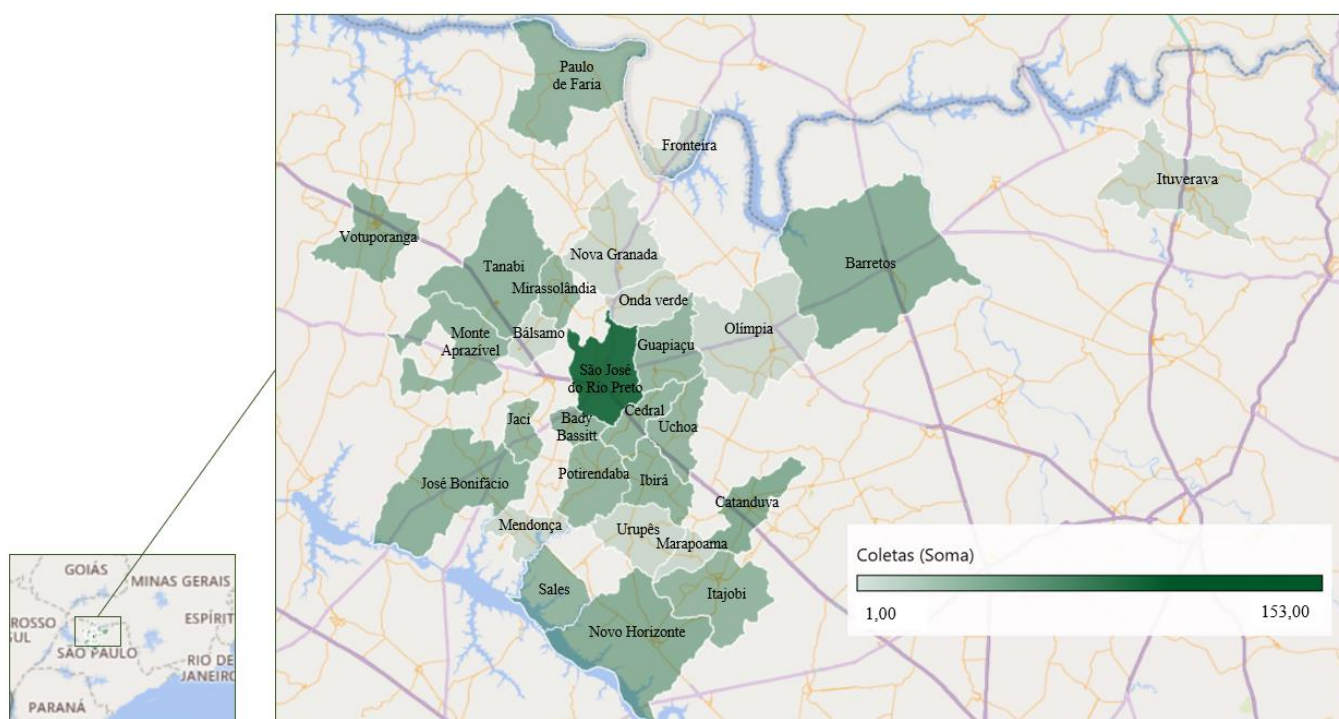
Fonte: Traduzido (Van Borm et al. 2017.)

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Coletas das amostras biológicas.

As 490 amostras de 245 espécimes aviárias foram coletadas da região de São José do Rio Preto, abrangendo cidades próximas onde os animais foram coletados e encaminhados ao Zoológico Municipal para receberem tratamentos (Figura 4. e Apêndice A.).

Figura 5. Os locais de coletas das espécies aviárias que foram levadas ao Zoológico municipal de São José do Rio Preto.



Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 4. Apêndice A, é possível notar que mais da metade das amostras são provenientes de São José do Rio Preto (60.00%), cidade na qual se encontra o Zoológico Municipal onde as amostras utilizadas na presente pesquisa foram obtidas. Além disso, São José do Rio Preto apresenta a maior população dentre as regiões, considerando que os resgates por órgãos ambientais, que é uma das vias pelas quais os animais chegam ao Zoológico para receber tratamento, são também provenientes de denúncias da população.

Seguido por Catanduva (4.31%), Nova Horizonte (3.92%), Barretos (3.13%), Mirassol (2.74%), José Bonifácio (2.35%), Votuporanga (1.96%), Bady Bassit (1.96%), Tanábi (1.96%), Ibirá (1.56%), Cedral (1.17%). As cidades de Guapiaçu (0.78%), Itajobi (0.78%), Jaci (0.78%), Mirassolândia (0.78%), Monte Aprazível (0.78%), Paulo de Faria (0.78%), Potirendaba (0.78%), Sales (0.78%), Uchoa (0.78%), Balsámo (0.39%), Fronteira (0.39%), Ituverava (0.39%), Marapoama (0.39%), Mendonça (0.39%), Nova Granada (0.39%), Olímpia (0.39%), Onda Verde (0.39%) e Urupês (0.39%), foram as cidades com as menores porcentagens de coleta das espécies aviárias. Por fim, apenas um local de coleta não foi identificado (0.39%).

As 29 cidades são do interior do estado de São Paulo, somente o município Fronteira pertence a outro estado, Minas Gerais. As espécies aviárias não pertencem somente a cidade de

São José do Rio Preto, mas também a região, permitindo uma observação mais abrangente da situação de saúde desses animais e dos locais onde foram coletadas. No entanto, vale ressaltar que em algumas cidades o número de coletas foi mais baixo, dessa forma seria necessário aumentar esse número para aumentar a confiabilidade em relação a situação encontrada na região.

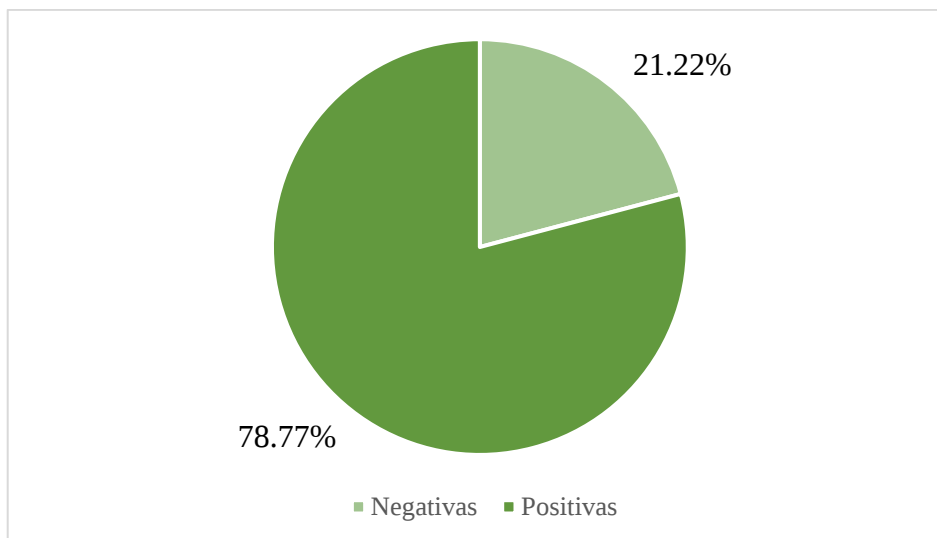
6. 2 RT-qPCR

Os resultados obtidos pela técnica RT-qPCR evidenciam que 193 (78.77%) espécimes aviárias testadas para controle endógeno foram positivas, enquanto 52 (21.22%) das 245 foram negativas (Gráfico 1.). O controle endógeno amplifica uma sequência naturalmente presente nas amostras “*gene Housekeeping*”, um gene conservado e constantemente expressado do organismo e leva em consideração os fatores que podem afetar o resultado da RT-qPCR, como a qualidade da amostra, degradação, eficiência do RT-qPCR, purificação e inibição (BORM et al., 2007, p. 213). Posto isto, é possível inferir que as 52 amostras negativas para o controle endógeno obtiveram certo nível de degradação, o que foi posteriormente relacionado ao local de armazenamento das amostras. Ou seja, por terem sido armazenadas em freezers de geladeiras comuns a -20°C. Sendo o problema sanado ao armazenar as amostras em freezers -80°C.

Em relação a detecção do vírus, todas as amostras testadas para o controle endógeno, adequadas para o teste, foram negativas para presença do vírus da gripe aviária. Sendo possível correlacionar a falta de resultados positivos à região de coleta dessas espécies aviárias, no interior de São Paulo, longe da região litorânea onde os focos de infecção foram registrados (Figura 2.). Considerando também que é um vírus notavelmente presente em espécies de ambientes mais úmidos e aquáticos (OLSEN et al., 2006), com demonstrações que o vírus da gripe permanece infeccioso na água de lagos por 4 dias a 22°C e mais de 30 dias em temperaturas menores (0°C). Com alta prevalência do vírus que se relaciona ao local aquático que os animais se encontram e a eficiência na transmissão via fecal-oral, é possível associar a incidência focos de infecção às regiões litorâneas do país, que são ambientes aquáticos (WEBSTER et al., 1978).

No entanto, aves migratórias são potenciais distribuidoras dos vírus por países e até continentes, conectando aves pelas principais rotas migratórias em criadouros ou locais de não reprodução em comum, infectando e transmitindo os patógenos para outras populações que então podem chegar a outras áreas (VAN DE KAM; ENS; PIERSMA, 2004). Portanto, a propagação do vírus em regiões mais afastadas do litoral, como nas regiões de São José do Rio Preto pode ocorrer.

Gráfico 1. Porcentagem das amostras que foram negativas para RT-qPCR do controle endógeno Beta-actina.



Fonte: Autoria própria.

6. 3 Espécies aviárias

No total foram coletadas 490 amostras orofaríngeas e cloacais de 245 espécimes aviárias, alcançando cerca de 15 ordens, 20 famílias e 44 espécies (Tabela 6). As amostras foram extraídas para obtenção do RNA total e então submetidas a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (RT-qPCR).

As ordens frequentemente encontradas na literatura como reservatórios que foram amostradas são aves de ambientes aquáticos como Anseriformes (patos, gansos e cisnes) e Charadriiformes (andorinhas-do-mar e limícolas) (Olsen et al., 2006, p. 384). Amostras dos animais coletados da ordem Anseriformes constituíram-se em apenas 10 (4.08%) e Pelecaniformes 7 (2.85%). O grande número de Psittaciformes 88 (35.91%) é devido à abundância de diversas “maritacas” na região do Estado de São Paulo.

Tabela 6. A classificação taxonômica das espécies que foram analisadas no presente projeto.

Classificação	Quantidade
Accipitriformes	14
Accipitridae	
<i>Geranoaetus albicaudatus</i>	2
<i>Rupornis magnirostris</i>	12
Anseriformes	10
Anatidae	
<i>Alopochen aegyptiaca</i>	1
<i>Cairina moschata</i>	5
<i>Dendrocygna autumnalis</i>	1
<i>Nomonyx dominicus</i>	1

<i>Spatula querquedula</i>	1
Anhimidae	
<i>Anhima cornuta</i>	1
Caprimulgiformes	2
Caprimulgidae	
<i>Nyctidromus albigollis</i>	2
Cariamiformes	15
Cariamidae	
<i>Cariama cristata</i>	15
Cathartiformes	13
Cathartidae	
<i>Coragyps atratus</i>	13
Charadriiformes	1
Charadriidae	
<i>Vanellus chilensis</i>	1
Columbiformes	26
Columbidae	
<i>Columba livia</i>	5
<i>Columbina</i>	1
<i>Patagioenas picazuro</i>	18
<i>Zenaida auriculata</i>	2
Cuculiformes	1
Cuculidae	
<i>Guira guira</i>	1
Falconiformes	13
Falconidae	
<i>Caracara plancus</i>	9
<i>Falco sparverius</i>	4
Nyctibiiformes	2
Nyctibiidae	
<i>Nyctibius griseus</i>	2
Passeriformes	6
Icteridae	
<i>Gnorimopsar chopi</i>	1
<i>Icterus pyrrhopterus</i>	1
Thraupidae	
<i>Thraupis sayaca</i>	1
Tyrannidae	
<i>Colaptes campestris</i>	1
<i>Pitangus sulphuratus</i>	1
<i>Tyrannus savana</i>	1
Pelecaniformes	7
Ardeidae	
<i>Ardea alba</i>	1

<i>Bubulcus-ibis</i>	1
<i>Butorides striata</i>	1
Threskiornithidae	
<i>Theristicus caudatus</i>	4
Piciformes	16
Ramphastidae	
<i>Pteroglossus castanotis</i>	1
<i>Ramphastos toco</i>	15
Psittaciformes	88
Psittacidae	
<i>Amazona aestiva</i>	5
<i>Amazona amazonica</i>	2
<i>Ara ararauna</i>	3
<i>Aratinga auricapillus</i>	1
<i>Brotogeris chiriri</i>	10
<i>Eupsittula aurea</i>	13
<i>Psittacara leucophthalmus</i>	54
Strigiformes	30
Strigidae	
<i>Athene cunicularia</i>	11
<i>Megascops choliba</i>	2
<i>Pulsatrix perspicillata</i>	1
<i>Strix virgata</i>	4
Tytonidae	
<i>Tyto furcata</i>	12
Não identificado	1
Total Geral	245

Fonte: Autoria própria

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do RT-qPCR para Influenza A das 490 amostras de 245 espécimes aviárias da região de São José do Rio Preto foram negativas. Indicando ausência da infecção pelo vírus. Esses resultados sugerem que devido à localização no interior de São Paulo, distante da região litorânea do país onde diversos surtos estão sendo relatados do vírus H5N1.

Em relação aos 21.22% das amostras que foram negativas para o controle endógeno Beta-actina, observou-se que devido ao armazenamento das amostras em freezer de geladeiras comuns (-20°C) após a coleta, ocorreu degradação do material biológico até o momento de serem encaminhadas ao laboratório e analisadas.

Por fim, devido ao aumento dos números de casos do subtipo H5N1 no Brasil, incluindo casos notificados no estado de São Paulo, é possível que a presença de Influenza A, na região de São José do Rio Preto seja detectada em breve. O IAV tem alto potencial de propagação e alguns subtipos apresentam alta patogenicidade, como no caso do H5N1, sendo responsáveis por diversas mortes. O monitoramento de um vírus que prevalece a tantos séculos causando pandemias, provocando mortes é essencial para impedir que o presente repita a história.

REFERÊNCIAS

- ALI, S. T. et al. Influenza seasonality and its environmental driving factors in mainland China and Hong Kong. **Science of the Total Environment**, v. 818, 20 abr. 2022.
- ANTAS, P. DE T. Z. MIGRATION OF NEARCTIC SHOREBIRDS (CHARADRIIDAE AND, SCOLOPACIDAE) i-N BRASIL-FLYWAYS AND THEIR DIFFERENT SEASONAL USE. **Wader Study Group Bulletin**, p. 52–56, 1983.
- BAUMGARTNER, E. A. et al. Seasonality, timing, and climate drivers of influenza activity worldwide. **Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 6, p. 838–846, 15 set. 2012.
- BELSHE, M. D.; ROBERT, B. The Origins of Pandemic Influenza — Lessons from the 1918 Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 21, p. 2209–2211, 2005.
- BORM, S. Van et al. A Universal Avian Endogenous Real-Time Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction Control and Its Application to Avian Influenza Diagnosis and Quantification. **Avian Diseases**, v. 51, s1, p. 213–220, mar. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1637/7552-033106r.1>. Acesso em: 1 nov. 2023.
- BROXMEYER, L. **Bird flu, influenza and 1918: The case for mutant Avian tuberculosis**. **Medical Hypotheses** Medical Hypotheses, 2006.
- CDC, C. F. D. C. A. P. Influenza Current Situation Summary. 2023.
- COX, N. J.; TROCK, S. C.; UYEKI, T. M. Public health implications of animal influenza viruses. Em: DAVID E. SWAYNE (Ed.). **Animal Influenza**. 2. ed. John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 92–132.
- EISFELD, A. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. At the centre : influenza A virus ribonucleoproteins. v. 13, n. JANUARY, 2015.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Global AIV with Zoonotic Potential**. 28 set. 2023. Disponível em: <https://www.fao.org/animal-health/situation-updates/global-aiv-with-zoonotic-potential/en>. Acesso em: 26 out. 2023.
- GRONESOVÁ, P.; MIŽÁKOVÁ, A.; BETÁKOVÁ, T. Determination of hemagglutinin and neuraminidase subtypes of avian influenza A viruses in urban pigeons by a new nested RT-PCR. p. 213–216, 2009.

HAUSE, Ben M. et al. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. **mBio**, v. 5, n. 2, 4 mar. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mbio.00031-14>. Acesso em: 1 nov. 2023.

ICMBIO, I. C. M. D. C. D. B. **Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: https://www.gov.br/icmbio/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/relatorios/relatorio_de_rotas_e_areas_de_concentracao_de_aves_migratorias_brasil_3edio_2019.pdf. Acesso em: 16 set. 2023.

KORSMAN, S. N. (2014). *Virologia*. Rio de Janeiro: Grupo GEN.

LAMB, R. A. Influenza. In: LAMB, R. A. **Encyclopedia of Virology**. [S. l.]: Elsevier, 2008. p. 95-104. ISBN 9780123744104. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-012374410-4.00654-3>. Acesso em: 17 jan. 2024.

MALIK, G.; ZHOU, Y. Innate immune sensing of influenza a virus. **Viruses**, v. 12, n. 7, 2020.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA. **Brasil registra primeiros casos de Influenza Aviária de Alta Patogenicidade em aves silvestres, Mapa alerta para cuidados**. 16 maio 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/brasil-registra-caso-de-gripe-aviaria-em-aves-silvestres-mapa-alerta-para-cuidados>. Acesso em: 26 out. 2023.

MERCIER, E. et al. Municipal and neighbourhood level wastewater surveillance and subtyping of an influenza virus outbreak. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.

MOSHINSKY, M. Avian Influenza (Including Infection with High Pathogenicity Avian Influenza Viruses). **Nucl. Phys.**, v. 13, n. 1, p. 104–116, 1959.

MOSTAFA, A. et al. Zoonotic Potential of Influenza A Viruses : A Comprehensive Overview. n. Figure 1, p. 1–38, 2018.

MURRAY, P. (2017). *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Grupo GEN.

OLSEN, B. et al. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. **Science**, v. 312, n. 5772, p. 384-388, 21 abr. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1122438>. Acesso em: 1 nov. 2023.

OPAS/OMS, O. P.-A. DA S. / O. M. DA S. **Alerta Epidemiológico: Surto de influenza aviária causados por influenza A(H5N1) na Região das Américas**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: www.paho.org.

PEARCE, J. M. et al. Limited evidence of trans-hemispheric movement of avian influenza viruses among contemporary North American shorebird isolates. **Virus Research**, v. 148, n. 1–2, p. 44–50, mar. 2010.

POTTER, C. W. A history of influenza. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 4, p. 572-579, out. 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01492.x>. Acesso em: 1 nov. 2023.

PREFEITURA DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO. **Zoológico é um dos locais públicos mais visitados de Rio Preto**. 9 jan. 2019a. Disponível em: <https://www.riopreto.sp.gov.br/zoologico-e-um-dos-locais-publicos-mais-visitados-de-rio-preto/#:~:text=O%20Zoológico%20Municipal%20de%20São%20José%20do%20Rio%20Preto%20possui,do%20Estado%20de%20São%20Paulo>. Acesso em: 26 out. 2023.

RAMOS, Graciliano. *Vidas Secas*. 41ª de. São Paulo: Record, 1978.

RODRIGUES, C. R. et al. Temporal variations of body mass and plumage in *Arenaria interpres* (Aves: Scolopacidae) along the Brazilian coast. **Zoologia**, v. 3, p. 386–390, 2009.

RUST, M. J. et al. viruses during viral entry. **Author Manuscript**, v. 11, n. 6, p. 567–573, 2009.

SCHOLTE, F. et al. Dissection of the Influenza A Virus Endocytic Routes Reveals Macropinocytosis as an Alternative Entry Pathway. v. 7, n. 3, 2011.

SOUSA, E. DE et al. **Presence of antibodies against H5, H7 and H9 influenza A virus in wild birds in the State of São Paulo, Brazil**. [s.l: s.n.].

SPACKMAN, E. et al. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. v. 40, n. 9, p. 3256–3260, 2002.

STURM-RAMIREZ, K. M. et al. Reemerging H5N1 Influenza Viruses in Hong Kong in 2002 Are Highly Pathogenic to Ducks. v. 78, n. 9, p. 4892–4901, 2004.

THOMAZELLI, L. M. et al. Molecular Surveillance of the Newcastle Disease Virus in Domestic and Wild Birds on the North Eastern Coast and Amazon Biome of Brazil. v. 14, p. 01–07, 2012.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., & CASE, C. L. (2017). *Microbiologia*. Porto Alegre: Grupo A.

UYEKI, Timothy M. et al. Influenza. **The Lancet**, v. 400, n. 10353, p. 693-706, ago. 2022. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(22\)00982-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(22)00982-5). Acesso em: 27. Out 2023.

VAN BORM, S. et al. **A universal avian endogenous real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction control and its application to avian influenza diagnosis and quantification**. Avian Diseases. **Anais...American Association of Avian Pathologists**, 2007.

VAN DE KAM, J.; ENS, B.; PIERSMA, T. Shorebirds: An Illustrated Behavioural Ecology. **KNNV Publishers**, 2004.

WEBSTER, Robert G. et al. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. **Virology**, v. 84, n. 2, p. 268-278, fev. 1978. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90247-7). Acesso em: 1 nov. 2023.

WEBSTER, R. G. et al. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. v. 56, n. 1, p. 152–179, 1992.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH. **Terrestrial Code Online Access - WOA - World Organisation for Animal Health**. 2023. Disponível em: <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/>. Acesso em: 28 out. 2023.

WOLFE, Marlene K. et al. Wastewater-Based Detection of Two Influenza Outbreaks. **Environmental Science & Technology Letters**, 5 jul. 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.2c00350>. Acesso em: 29 out. 2023.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). **Statement on avian influenza and mammals**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.woah.org/en/statement-on-avian-influenza-and-mammals/>. Acesso em: 16 set. 2023.

WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (WOAH). Human infection with avian influenza A(H5) viruses. Disponível em: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_20231006.pdf?sfvrsn=5bc7c406_32. Acesso em: 13 out. 2023.

APÊNDICE A – Tabela de quantidade e porcentagem de espécies aviárias por municípios.

Local de coleta	Contagem	%
-	1	0.39
Bady Bassit	5	1,96
Balsámo	1	0.39
Barretos	8	3.13
Catanduva	11	4.31
Cedral	3	1.17
Fronteira	1	0.39
Guapiaçu	2	0.78
Ibirá	4	1.56
Itajobi	2	0.78
Ituverava	1	0.39
Jaci	2	0.78
José Bonifácio	6	2.35
Marapoama	1	0.39
Mendonça	1	0.39
Mirassol	7	2.74
Mirassolândia	2	0.78
Monte Aprazível	2	0.78
Nova Granada	1	0.39
Nova Horizonte	10	3,92
Olímpia	1	0.39
Onda Verde	1	0.39
Paulo de Faria	2	0.78
Potirendaba	2	0.78
Sales	2	0.78
São José do Rio Preto	153	60.00
Tanábi	5	1,96
Uchoa	2	0.78
Urupês	1	0.39
Votuporanga	5	1,96
Total geral	245	100%