

Paola Ferraz Sinhorini

**IDENTIFICAÇÃO DE INFLUENZA AVIÁRIA E NEWCASTLE EM
AMOSTRAS DE ESGOTO DA REGIÃO DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO.**

São José do Rio Preto
2023

Paola Ferraz Sinhorini

**IDENTIFICAÇÃO DE INFLUENZA AVIÁRIA E NEWCASTLE EM
AMOSTRAS DE ESGOTO 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.

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Paula Rahal
Coorientador: Dr. Vivaldo Gomes da Costa

São José do Rio Preto
2023

S
6
1
7
i

Sinhorini, Paola Ferraz

Identificação de Influenza Aviária e Newcastle em amostras de esgoto da região de São José do Rio Preto / Paola Ferraz Sinhorini. -- São José do Rio Preto, 2023

51 p. : tabs., fotos, 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

Coorientador: Vivaldo Gomes da Costa

1. Águas residuais. 2. Vírus da influenza aviária. 3. Vírus da doença de Newcastle. 4.

Doenças aviárias. 5. Vigilância ambiental. 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.

Paola Ferraz Sinhorini

**IDENTIFICAÇÃO DE INFLUENZA AVIÁRIA E NEWCASTLE EM
AMOSTRAS DE ESGOTO 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.

Comissão Examinadora

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

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

Dr. Guilherme Rodrigues Fernandes Campos
FAMERP- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Membro titular

Ms. Tamara de Carvalho
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Membro titular

Prof^ª. Dr^ª. Maria Stela Maioli Castilho Noll
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto
Membro suplente

São José do Rio Preto
04 de dezembro de 2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Rosângela e Carlos, por terem sempre me apoiado em meus estudos, procurado pelas melhores oportunidades e por terem sempre me incentivado a ir atrás dos meus objetivos e meu sucesso.

Ao meu irmão, Enrico, por ter despertado minha curiosidade sobre biologia.

Aos meus avós, Elza, Jamir, Maria e Alcir, por terem compartilhado comigo os mais lindos ensinamentos sobre a natureza e a vida com suas próprias vivências e por terem me dado tanto amor e apoio sempre.

Aos meus amigos, que estiveram comigo em momentos felizes, difíceis e me ajudaram quando precisei.

À minha orientadora, Prof. Dr. Paula Rahal, por ter me dado a oportunidade de trabalhar no laboratório, me proporcionando tantos ensinamentos e aprendizados.

Ao meu coorientador, Vivaldo Gomes da Costa, pela paciência, ajuda, aprendizados e por ter compartilhado comigo seu conhecimento.

À Camila, colega de laboratório que se tornou uma grande amiga, pelos ensinamentos, ajuda nos experimentos e pelo apoio.

Aos meus amigos de laboratório, pelo apoio nas tarefas de laboratório e por todo o aprendizado que tive.

Ao SEMAE, por ter proporcionado as amostras de esgoto para que esse projeto se tornasse possível.

Ao Marcelo, por ter me apoiado tanto durante a graduação.

RESUMO

O Brasil ocupa o 2º lugar no ranking de exportação de frango do mundo. Essa posição detém uma boa parte da economia do país. Dessa forma, doenças que afetam as aves nas granjas são de suma importância e requerem investigação, pois o acometimento dos frangos por doenças mortais causa enormes prejuízos na economia. Duas doenças de grande importância na avicultura são a Influenza Aviária e a doença de Newcastle. No caso de ambas as doenças, se as aves forem infectadas, todo o plantel deve ser sacrificado, devido à alta capacidade de transmissão do vírus e sua consequente mortalidade. As duas doenças são transmitidas principalmente por aves migratórias silvestres para aves domésticas. Isso gera grande preocupação no comércio avícola, uma vez que essas aves não têm controle de entrada e saída no país. Portanto, uma das maneiras mais eficazes de monitorar a presença do vírus no país é por meio da análise e detecção de material genético em águas residuais, uma vez que os resíduos urbanos se concentram nelas e que, atualmente são consideradas, uma ferramenta de alerta precoce para o monitoramento e a tendência de infecção de diversas doenças virais. Além disso, a vigilância de águas residuais permite a detecção de doenças que acometem a população antes mesmo de gerar sintomas, possibilitando assim, uma profilaxia caso seja detectada. Assim, o objetivo deste estudo é identificar a presença do vírus da Influenza aviária e Newcastle em amostras de esgoto bruto da cidade de São José do Rio Preto ao longo de 12 meses, comparando os resultados com a sazonalidade. Para isso, foram analisadas 52 amostras correspondentes a cada semana durante um ano, de setembro de 2022 a setembro de 2023. Primeiramente, foi realizada a clarificação dessas amostras para a formação do pellet viral, seguida pela extração de RNA. Ao final, foi conduzido o PCR em tempo real para os dois vírus, com a utilização de controles positivos e controle exógeno (*Pepper Mild Mottle Virus*). Ao término do estudo, todas as 52 amostras resultaram negativas para os dois vírus, e o controle exógeno positivou conforme o esperado, evidenciando o sucesso deste estudo piloto na vigilância ambiental contra os vírus da doença de Newcastle e da Influenza aviária.

Palavras-chave: Águas residuais. Vírus da influenza aviária; Vírus da doença de Newcastle; Doenças aviárias; Vigilância ambiental; PCR em tempo real; Controle exógeno.

ABSTRACT

Brazil occupies 2nd place in the ranking of chicken exports in the world. This position holds a good part of the country's economy. Therefore, diseases that affect birds on farms are of paramount importance and require investigation, as chickens being affected by deadly diseases causes enormous losses to the economy. Two diseases of great importance in poultry farming are Avian Influenza and Newcastle disease. In the case of both diseases, if the birds are infected, the entire flock must be terminated, due to the high transmission capacity of the virus and its consequent mortality. The two diseases are mainly transmitted by wild migratory birds to domestic birds. This raises great concern in the poultry trade, since these birds have no control over their entry and exit into the country. Therefore, one of the most effective ways to monitor the presence of the virus in the country is through the analysis and detection of genetic material in wastewater, since urban waste is concentrated in wastewater and which is currently considered an early warning tool for monitoring and infection trends of various viral diseases. Furthermore, wastewater surveillance allows the detection of diseases that affect the population even before they generate symptoms, thus enabling prophylaxis if detected. Therefore, the objective of this study is to identify the presence of avian influenza and Newcastle viruses in samples of raw sewage from the city of São José do Rio Preto over 12 months, comparing the results with seasonality. For this, 52 samples corresponding to each week were analyzed for one year, from September 2022 to September 2023. First, these samples were clarified to form the viral pellet, followed by RNA extraction. Finally, real-time PCR was conducted for both viruses, using positive controls and exogenous control (Pepper Mild Mottle Virus). At the end of the study, all 52 samples were negative for both viruses, and the exogenous control was positive as expected, demonstrating the success of this pilot study in environmental surveillance against Newcastle disease and avian influenza viruses.

Keywords: Residual waters. Avian influenza virus; Newcastle disease virus; Avian diseases; Environmental surveillance; Real-time PCR; Exogenous control.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura geral do vírus Influenza A.	14
Figura 2 – Ciclo de vida do vírus Influenza.	15
Figura 3 – Rotas migratórias das aves aquáticas silvestres.	17
Figura 4 – Casos humanos de Influenza aviária, desde 1997.	18
Figura 5 – Diagrama esquemático da estrutura do vírus da doença de Newcastle.	20
Figura 6 – Representação esquemática da replicação do vírus da doença de Newcastle.	22
Figura 7 – Curva de amplificação do vírus Pepper em PCR em tempo real.	36
Figura 8 – Curva de amplificação em uma PCR em tempo real para Newcastle.	39
Figura 9 – Curva de amplificação do controle positivo do vírus Influenza.	39
Figura 10 – Casos de Influenza aviária confirmados no Estado de São Paulo.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de primers e sondas utilizadas na RT-qPCR de Influenza A.	33
Tabela 2 – Sequência de primers e sondas utilizados para RT-qPCR do vírus Pepper.	34
Tabela 3 – Sequência de primers e sondas utilizados para RT-qPCR do vírus Newcastle.	34
Tabela 4 – Ct considerado positivo na etapa de PCR em tempo real.	35
Tabela 5 – Presença e ausência do vírus Influenza A, Newcastle e o controle exógeno.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNC: Doença Newcastle

HA: Hemaglutinina

IA: Influenza aviária

IABP: Influenza aviário de baixa patogenicidade

IAAP: Influenza aviário de alta patogenicidade

InFV: Vírus Influenza

IVA: Vírus Influenza A.

MAPA: Ministério da Agricultura e Pecuária

NA: Neuraminidase

NDV: Vírus da doença de Newcastle

NP: Nucleoproteína

PMMoV: *Pepper Mild Mottle Virus*

WWS: Vigilância de águas residuais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Características gerais dos vírus Influenza	11
1.1.1	Características da Influenza Aviária	12
1.1.2	A transmissão da Influenza Aviária	16
1.1.3	Transmissão da Influenza Aviária para humanos	17
1.1.4	Importância do controle da IA para a saúde pública e economia	18
1.2	Características gerais dos vírus Newcastle	19
1.2.1	Características específicas do vírus Newcastle	19
1.2.2	Transmissão da Doença de Newcastle	22
1.2.3	Patogenicidade da doença	22
1.2.4	Importância do controle da IA para a saúde pública e economia	24
1.3	Controle da Influenza Aviária e Doença de Newcastle	25
1.4	Análise de águas residuais como vigilância epidemiológica e ambiental	26
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA	29
3	OBJETIVOS	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1	Local de Estudo, Infraestrutura e Equipamentos	30
4.2	Tipo de Amostragem	30
4.3	Extração do RNA	31
4.4	RT-qPCR para detecção do vírus IA, Newcastle e PMMoV.	32
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO	39
7	CONCLUSÃO	41
	REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos países com a maior biodiversidade de aves silvestres, contando com 1.919 espécies (Eco, 2020). Dessas, 198 apresentam o comportamento de aves migratórias, sendo majoritariamente aquáticas (Eco, 2020). Além de toda a rica população de aves selvagens, o país também se destaca na criação de aves domésticas e de subsistência, como frangos, ocupando o 2º lugar no ranking mundial de produtores de frango (ABEF, 2023). Essa posição é geradora de empregos, exportações e renda para o país, sendo tão significativa que qualquer comorbidade que afete as aves de produção resulta em enormes prejuízos econômicos, tornando-se uma questão de saúde pública. Sem contar com toda a fauna aviária silvestre que é prejudicada e que deve ser conservada.

Uma das mais graves doenças que afetam as aves e geram perdas enormes é a Influenza Aviária, causada pelo vírus pertencente à família *Orthomyxoviridae*, do Tipo A (Buchen-Osmond, 2003), que possui diversos subtipos, sendo o mais comum o H5N1 (Medina, R. *et al.*, 2011). As aves mais frequentemente infectadas são patos, marrecos, gansos selvagens e gaivotas; e a forma que o vírus entra no país mais facilmente é pelas aves migratórias já citadas, que contaminam as aves silvestres brasileiras, transmitindo para aves domésticas e/ou de subsistência presentes em granjas (Consórcio Global, 2016).

Assim que uma ave é infectada, todo o plantel deve ser considerado em risco, visto que a transmissão da doença ocorre por meio de secreções nasais, fezes, ração e água, e acontece de maneira muito rápida (Ganar K, *et al.*, 2014). A Influenza aviária é uma doença de notificação federal devido à taxa de mortalidade, que chega aos 100% em menos de 48 horas depois que iniciam os sintomas (Gov.br, 2023). Em outras palavras, se uma ave é infectada, ela morre rapidamente e contamina outras aves devido à grande capacidade de transmissão. Portanto, como forma de proteção, caso uma ave de granja seja diagnosticada com o vírus, todo o plantel deve ser sacrificado para conter surtos (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009), gerando a paralisação das exportações e consequentes prejuízos econômicos.

Vale destacar que, em 2023, um alerta zoonosológico foi instaurado pelo Ministério da Agricultura e Pecuária devido à confirmação de casos de Influenza Aviária altamente patogênica no país. Isso significa que o Brasil ainda não está livre da doença, e uma vigilância contínua deve ser realizada para rastrear o vírus e permitir que medidas profiláticas sejam tomadas antes de um surto.

Outra doença aviária de notificação obrigatória, que representa a enorme importância devido à letalidade e transmissão é a Doença de Newcastle, causada por um vírus da família

Paramyxoviridae (Brown et al., 1999); também altamente patogênica. A transmissão ocorre por meio de secreções, fezes, cama de aviário, ração e água, ocorrendo descontroladamente; além disso, o vírus pode ser introduzido no país por aves migratórias. Por consequência, surtos dessa doença em granjas ou plantéis geram perdas econômicas inestimáveis. Como no caso da Influenza Aviária, se uma ave testa positivo para a doença, todo o plantel deve ser sacrificado para conter surtos subsequentes (Paulillo, A.C. *et al.*, 2000). Devido aos gastos e custos com vacinas e remédios, ela é considerada a doença de maior impacto entre as aves (Alexander, D.J., 2003).

No entanto, um diferencial da doença de Newcastle em relação à Influenza Aviária é a existência de vacinação (Ganar K. *et al.*, 2014). Todas as aves importadas que chegam ao Brasil são vacinadas contra a DNC, controlando a circulação do vírus no país e no mundo, sem nenhum caso registrado no Brasil desde 2006 (DSA, 2020). Contudo, é necessário manter a vigilância desse patógeno para garantir que não haja nenhum indício da ocorrência desse vírus no Brasil, que possa resultar em novos surtos.

Uma das maneiras mais eficientes de realizar a vigilância, é utilizando a pesquisa por meio das águas residuais, visto que não necessita de contato com as aves. Esse tipo de vigilância permite obter informações sobre as doenças infecciosas que afetam a população em diferentes períodos do ano, uma vez que, no caso da gripe, os vírus são eliminados nas fezes do paciente infectado (Chan *et al.*, 2011). Assim, esse rastreamento possibilita a identificação dos possíveis vírus que as aves migratórias poderiam trazer ao país, uma vez que o controle delas é dificultado por serem livres. À vista disso, caso essas aves defequem em locais comuns, os dejetos serão levados até uma Estação de Tratamento de Esgoto e poderão ser detectados. A vigilância de águas residuais é utilizada como uma importante ferramenta na detecção de vírus e é capaz de identificar possíveis surtos na cidade antes mesmo de sua ocorrência, facilitando e otimizando o tempo para que ações de prevenção e tratamento sejam tomadas antes que o vírus se espalhe (Randazzo, W. *et al.*, 2020). Dessa forma, a detecção precoce no caso das doenças aviárias daria tempo útil e necessário para que os serviços veterinários e granjas tomassem medidas preventivas para evitar a ocorrência de novos surtos.

1.1. Características gerais da doença e os tipos

Os vírus Influenza (InFV) possuem diversos tipos e subtipos e são os causadores de constantes epidemias e pandemias de gripe durante toda a história da civilização humana, acometendo e adoecendo milhares de pessoas por ano. Possuem 3 tipos: tipo A, tipo B e tipo

C, sendo o tipo A, o maior causador de gripes e surtos atualmente (Gaitonde, 2021). De acordo com a OMS, a pandemia de gripe foi considerada uma das 10 ameaças à saúde global em 2019 (Organização Mundial da Saúde, 2022). Nesse contexto, a primeira pandemia de Influenza conhecida foi a Gripe Espanhola, a qual ocorreu em 1918 e acometeu 50% da população com mais de 40 milhões de óbitos na época. No Brasil, cerca de 65% da população foi infectada e mais de 30 mil morreram (Alexander, 1995; Lvov *et al.*, 1978; Webster *et al.*, 1992); a gripe espanhola teve sua origem no vírus aviário do tipo A subtipo H1N1. Além disso, em 1957 houve a pandemia da chamada ‘gripe asiática’, e em 1968, a pandemia da ‘gripe de Hong Kong’; ambas também causadas pelo InFV. Estas pandemias resultaram em danos estimados em cerca de 32 bilhões de dólares para a economia mundial, principalmente devido à perda de produtividade, despesas com medicamentos e internações (World Health Organization, Influenza Fact Sheet 211, 1999). Coletivamente, essas informações demonstram o elevado impacto da Influenza no contexto de doenças infecciosas e suas consequências para a sociedade.

Em 2009 ocorreu a chamada ‘primeira pandemia do século 21’: a epidemia global da gripe H1N1 (uma cepa do vírus Influenza A) que infectava anteriormente porcos (Fiocruz, 2021). Esta também ficou conhecida como gripe suína e, após quatro meses da sua descoberta, disseminou-se com alta velocidade para mais de 120 países, visto que a vacina ainda não estava disponível a tempo hábil (Krammer, F. *et al.*, 2018). O Brasil foi seriamente afetado e houve mais de 44 mil pessoas com diagnóstico confirmado para a doença na referida época (Fiocruz, 2021). Dentre as causas que culminaram nesse desfecho epidemiológico, merece destaque o reconhecimento tardio da transmissão comunitária no país, gerando o descontrole da quantidade de infectados e, assim, era impossível rastrear o vírus e conter o seu avanço (Bellei; Melchior, 2011). Para monitorar e poder controlar uma pandemia de gripe, por exemplo, é necessária uma vigilância de rotina, justamente para que haja tempo hábil para a implementação de intervenções e contenções de saúde pública (Zheng, X., *et al.*, 2023).

1.1.1 Características da Influenza aviária.

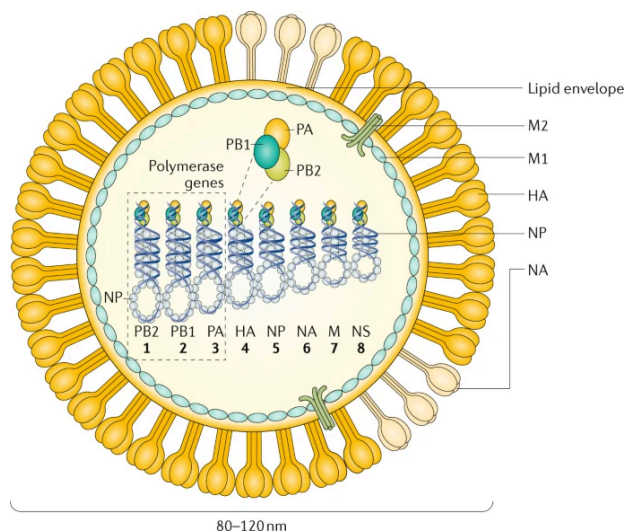
A Influenza aviária (IA), também conhecida como gripe aviária, é considerada uma doença altamente contagiosa com distribuição mundial e com picos de epidemia ao longo dos anos (Lupiani, 2009). É considerada uma das enfermidades avícolas da Lista A da Organização Mundial de Saúde Animal, de notificação obrigatória ao Serviço Veterinário Oficial do Brasil, devido sua grande capacidade de transmissão e letalidade (Revista de Saúde

Pública, 2006). Possui como agente etiológico o vírus da Influenza tipo A, pertencente à família *Orthomyxoviridae* e ao gênero *Influenzavirus* (Buchen-Osmond, 2003). Possui cadeias de RNA fita simples de sentido negativo, com oito segmentos, nucleocapsídeo envelopado e genoma segmentado. Apresenta diversos subtipos, sendo o mais comum, o H5N1, de alta patogenicidade e o que mais causa morte de aves atualmente. Surtos desse subtipo foram registrados pela primeira vez em Guangdong, na China em 1996, gerando diversos prejuízos econômicos e de saúde pública (Vijaykrishna D. *et al*, 2008).

Os oito segmentos genômicos dos InFV e, conseqüentemente, da IA, estão associados à nucleoproteína (NP) (Klumpp *et al.*, 1997), assim como a um complexo de polimerase viral (Brown, 2000), os quais são responsáveis por codificar subunidades da RNA polimerase e glicoproteínas virais, incluindo as hemaglutininas (HA) e neuraminidases (NA) (Krammer, F. *et al.*, 2018). Estas últimas são responsáveis pela variação nos subtipos de Influenza, como H1, H2, H3, N1 e N2, e localizam-se na superfície viral (Figura 1). A HA é a proteína encarregada da ligação do patógeno à célula hospedeira, enquanto a NA (N1 ou N2) auxilia na entrada do vírus na célula hospedeira (Kathryn D. Huggett; Floyd C. Knoop, 2007) por meio da degradação do ácido siálico presente no muco extracelular. Além disso, a NA também desempenha um papel crucial na dispersão do vírus, facilitando a ligação aos receptores de HA na superfície celular (Golono M., 2009).

De modo geral, os subtipos de HA são classificados em grupos com base em suas características estruturais. A gripe aviária pertence ao grupo 1, que inclui os clados H1a, H1b e HP, abrangendo o subtipo H1N1, responsável por epidemias previamente mencionadas em 1918 e 2009, bem como cepas sazonais de H1N1. Além disso, o grupo engloba os subtipos H5 HA, que incluem as cepas H5N1 da gripe aviária altamente patogênica (Medina, R. *et al.*, 2011).

Figura 1: Estrutura geral do vírus Influenza A. Demonstração do tamanho e características como glicoproteínas de superfície (hemaglutininas e neuraminidases), proteínas M1 e M2 e as três subunidades de RNA polimerase: PB1, PB2 e PA.

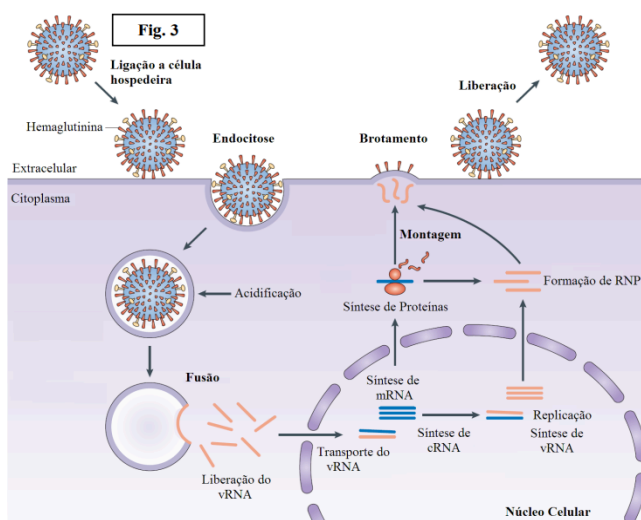


Fonte: Krammer, F., Smith, GJD, Fouchier, RAM et al. Gripe (2018).

Os três maiores segmentos de RNA do vírus codificam as três subunidades de RNA polimerases, dependentes do RNA viral (PB1, PB2 e PA), que são responsáveis pela replicação na célula infectada e hospedeira (Krammer, F. *et. al*, 2018). Além disso, os segmentos 6 e 8 do RNA codificam mais de uma proteína: a proteína da matriz (M1), a proteína de membrana (M2) e a proteína não estrutural NS1 (Krammer, F. *et. al*, 2018). A proteína M1 é envolvida por uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira (Braakman; Anken, 2000) e é responsável por fornecer uma estrutura que auxilia o vírion e regula o tráfego dos segmentos virais na célula. Por outro lado, a proteína M2 é um canal iônico de prótons necessário para a entrada e saída viral (Krammer, F. *et. al*, 2018). Ela também permite a acidificação do interior dos vírions quando estão nos endossomos celulares, favorecendo o desempacotamento viral (Hilleman, 2002). Quanto à proteína NS1, ela é responsável por inibir as respostas antivirais do hospedeiro nas células infectadas (Krammer, F. *et. al*, 2018).

Assim que um animal é infectado pelo vírus, este alcança uma célula e as partículas virais, por meio da HA, se ligam aos receptores na superfície celular do hospedeiro, permitindo a entrada do vírus na célula (Figura 2). Posteriormente, os nucleocapsídeos migram para o núcleo da célula e as proteínas polimerases iniciam a transcrição dos RNAs dos vírions (vRNAs) em mRNA. Estes últimos são utilizados na tradução de proteínas virais (Yewdell; García-Sastre, 2002). Devido ao fato de que a infecção pelo vírus da IA ocorre principalmente em células de rápida multiplicação, como as do trato respiratório e digestivo, secreções respiratórias e fezes podem conter uma carga viral elevada (Revista de Saúde Pública, 2006).

Figura 2: Ciclo de vida do vírus Influenza. Demonstração da ligação do patógeno com a célula hospedeira, a endocitose para o citoplasma a partir da acidificação, a liberação do vRNA que é direcionado ao núcleo celular, a síntese de proteínas para a formação de RNP e o brotamento de um novo vírus.



Fonte: Modificado de Itzstein 2007. Yewdell e García-Sastre, Influenza vírus still surprises, 2002.

O IVA possui uma elevada variabilidade antigênica, o que contribui para a sua rápida disseminação entre diversos reservatórios animais, incluindo porcos, cavalos, aves, focas e baleias. Isso ocorre devido à alteração das propriedades antigênicas das glicoproteínas de superfície, como as HA e as NA, permitindo-lhe escapar do sistema imunológico do hospedeiro e, conseqüentemente, gerar novos picos de epidemias e pandemias (Golono, M., 2009).

A gripe aviária é responsável por causar graves danos ao comércio de aves, sejam elas domésticas ou selvagens, e também pode afetar suínos, bovinos e seres humanos (GOV.BR, 2023). Nas aves, o risco de infecção é elevado, uma vez que a disseminação no plantel ocorre rapidamente, afetando múltiplos órgãos e resultando em uma taxa de mortalidade de até 100% das aves afetadas em menos de 48 horas. A IA é dividida em dois tipos: de baixa patogenicidade (IABP), que geralmente causam poucos ou nenhum sinal clínico nas aves, e de alta patogenicidade (IAAP), devido aos graves sinais clínicos e altas taxas de mortalidade aviária (Gov.br, 2023). Os sintomas mais comuns que devem ser observados incluem dificuldade respiratória, secreção nasal ou ocular, torcicolo, diarreia e dificuldade de locomoção, podendo levar à morte (Mapa). Em 2005, um vírus IAAP H5N1 foi responsável por surtos em aves aquáticas no lago Qinghai, no oeste da China, resultando em uma elevada mortalidade das aves e levantando preocupações sobre o potencial do vírus em causar danos ambientais e econômicos (Chen H. *et al*, 2005). A cepa H5N2 da IAAP surgiu provavelmente

de mutações no local de clivagem da HA, devido à introdução de um vírus IABP da cepa H5N2 de aves selvagens em aves domésticas (Vijaykrishna, D. *et al*, 2008).

1.1.2 A transmissão da Influenza aviária

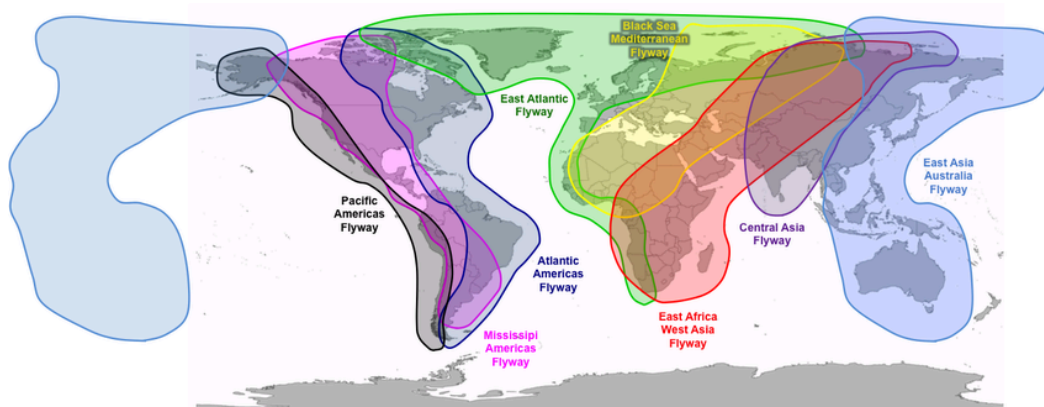
A transmissão dentro dos plantéis ocorre de forma acelerada, uma vez que pode se dar por meio de secreções nasais, fezes, ração, água, ovos e carcaças de animais contaminados. Além disso, o IVA pode se alojar em roupas, calçados, veículos e outros materiais; nesse sentido, até mesmo roedores podem transportar os vírus para as granjas (Ganar K, *et al*, 2014). Uma vez que o vírus chega às granjas, o controle é dificultado, principalmente devido ao período de incubação do vírus, que é de 3 dias, mas nos plantéis pode se estender a até 14 dias. Isso significa que as aves nos plantéis tornam-se mais suscetíveis à contaminação, uma vez que, até que uma ave infectada apresente sintomas, diversas outras já podem ter sido infectadas (Rev. Saúde Pública, 2006).

As aves domésticas mais suscetíveis à contaminação por IA incluem patos, galinhas, codornas, faisões e gansos, enquanto aves silvestres como gansos selvagens, marrecos, gaivotas e garças também apresentam alta suscetibilidade. Análises de amostras de esgoto e de rios, conduzidas por Webster, R. G, *et. al* (1992), sugerem que as aves aquáticas, especialmente os Anseriformes e Charadriiformes (Domanska-Blicharz *et al*, 2010), representam os principais reservatórios naturais do vírus com potencial pandêmico (Webster *et. al*, 1992). Estas aves, quando contaminadas, não apresentam sintomas, o que lhes permite transportar o vírus por longas distâncias, facilitando sua disseminação e possibilitando a infecção de aves saudáveis (GOV.BR, 2023). Estudos sobre a ecologia dos InFV demonstraram que estes são perpetuados em aves aquáticas, levando à hipótese de que estas constituem a fonte primária de todos os InFV em outras espécies (Hinshaw, V. S. *et al*, 1982).

A introdução do vírus no país e a subsequente transmissão ocorrem principalmente por meio de aves migratórias, que trazem o patógeno ao Brasil. Essas aves se reúnem em locais de reprodução e disseminam os vírus ao longo de suas principais rotas de voo (Consórcio Global, 2016). Além disso, algumas aves originadas no Brasil migram para outros locais durante os períodos de descanso reprodutivo. Com isso, elas podem retornar ao país contaminadas, disseminando o vírus para aves não migratórias e até mesmo para países vizinhos (Golono, M., 2009). Várias aves também deixam seus países de origem e chegam ao Brasil em busca de alimento, o que representa um risco, visto que o Brasil possui medidas de proteção contra a IA, o que pode não ocorrer nos países de origem dessas aves (Golono, M., 2009).

Em maio de 2023, o Ministro da Agricultura do Brasil declarou emergência zoonossanitária devido à detecção do IAAP (H5N1) em aves silvestres no país. Preocupantemente, o início do alerta coincide com o período de migração das aves no Brasil, ou seja, início do outono e da primavera (Governo do Estado de São Paulo, 2023). No Brasil, foram registradas 152 espécies de aves migratórias, das quais 101 são aves aquáticas. Entre as diversas rotas migratórias, duas passam pelo Brasil: a rota migratória do Atlântico, que ocorre principalmente no litoral do país, e a rota migratória do Mississippi, que atravessa o interior do país (Figura 3) (Golono, M., 2009). O período de migração das aves coincide com o clima frio no Brasil, o que agrava a situação, visto que, de acordo com Katarzyna Domanska-Blicharz *et al.* (2010), um estudo sobre a sobrevivência do vírus H5N1 em diferentes tipos de água e concentrações revelou que o vírus pode sobreviver em temperaturas abaixo de 4°C e em ambientes úmidos. Portanto, o vírus chega ao país na época mais fria e mantém sua estabilidade, aumentando o risco de contaminação e infecção.

Figura 3: Rotas migratórias das aves aquáticas silvestres. Demonstração das principais rotas migratórias que passam pelo Brasil.



Fonte: Hurtado, Renata, Vigilância Epidemiológica dos Vírus da Influenza Aviária em Aves Migratórias na Região Costeira da Amazônia, 2014.

1.1.3 Transmissão da IA para humanos

Alguns subtipos do InFV, como o IA, podem ser transmitidos entre diferentes espécies, incluindo os humanos, se estes tiverem contato direto com aves infectadas ou através do contato indireto com as secreções das aves contaminadas. Nos seres humanos, os sintomas da IA assemelham-se aos da gripe, no entanto, as taxas de mortalidade são elevadas para os indivíduos contaminados. Como consequência, se a transmissão ocorrer de forma abrupta, envolvendo cepas com grandes variações antigênicas em uma população sem imunidade, o

desfecho epidemiológico tende a evoluir para proporções pandêmicas (Kathryn D. Huggett; Floyd C. Knoop, 2007). Portanto, além de toda a preocupação com o comércio e com as aves, o vírus da IA é uma questão de saúde pública, pois, embora raro, pode infectar seres humanos, o que aumenta a possibilidade de surgirem novas cepas mais letais (Figura 4).

Figura 4: Casos humanos de Influenza aviária, desde 1997.

Ano	Local	Cepa	Casos
1997	Hong Kong	H5N1	Infecção em aves e no homem. Vírus aviário descrito pela primeira vez no homem. Dezoito pessoas hospitalizadas e seis óbitos. Disseminação de aves para o homem. Rara a transmissão pessoa a pessoa.
1999	China e Hong Kong	H9N2	Doença em duas crianças; ambas evoluíram para a cura. Vários outros casos em 1998 e 1999 na China Continental.
2002	Virgínia (EUA)	H7N2	Surto em aves. Uma pessoa com evidências sorológicas de infecção.
2003	China e Hong Kong	H5N1	Dois casos em uma família de Hong Kong que havia viajado para a China. A fonte de infecção não foi determinada.
2003	Holanda	H7N7	Surto em fazendas de aves, seguidos por infecções em porcos e no homem. Infecção confirmada em 89 pessoas e somente um óbito. Transmissão de aves para o homem, possivelmente três casos com transmissão pessoa a pessoa.
2003	Hong Kong	H9N2	Um caso humano: uma criança que se recuperou.
2003	Nova York (EUA)	H7N2	Um paciente hospitalizado que se recuperou.
2004	Tailândia e Vietnã	H5N1	Doze casos humanos confirmados na Tailândia e 23 no Vietnã, com um total de 23 mortes.
2004	Canadá	H7N3	Infecções em tratadores de aves. Constatada infecção ocular.
2004-2005	Tailândia e Vietnã	H5N1	Surto – aves em vários países da Ásia, seguidos por infecções esporádicas no homem, desde junho de 2004 e continua em 2005. Um caso possível de transmissão inter-humana.
2004-2005	Vietnã e Camboja	H5N1	Entre dezembro de 2004 e junho de 2005, 60 casos com 18 óbitos no Vietnã e 4 casos fatais no Camboja.
2005	Romênia e Turquia	H5N1	Circulando em aves. Não há ainda casos humanos.

Fonte: Revista de Saúde Pública, 2006.

1.1.4 Importância do controle da IA para a saúde pública e economia.

Assim, percebe-se que a gripe aviária representa um problema econômico e de saúde pública no país. Se um animal de uma granja é infectado, todo o plantel deve ser sacrificado para conter surtos, resultando na completa paralisação das importações e exportações de carne e insumos derivados de granjas. De acordo com a Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de Frango (ABEF, 2023), o Brasil ocupa o 2º lugar no ranking de produtores de frango. Já no ranking de exportadores, o Brasil está em primeiro lugar, o que destaca a relevância econômica e a necessidade de controle dessa doença no país. Até 27 de outubro de 2023, o Brasil registrou 135 casos positivos de IAAP, sem contar os casos em investigação e os casos em andamento. Dos casos confirmados, 132 ocorreram em aves silvestres, 3 em aves de subsistência e nenhum em aves comerciais (MAPA, 2023). Isso evidencia a urgência de controlar a doença no país, dada a confirmação dos casos no Brasil, em 2023, a partir de maio e a possibilidade de mais aves serem infectadas.

Em 2005, a Organização Mundial da Saúde projetou uma pandemia causada pelo H5N1 que poderia afetar de 20 a 50% da população mundial. Isso destaca a importância de o país estar preparado para qualquer tipo de situação, permitindo-se precaver a tempo e elaborar

planos de contingência para evitar a disseminação do vírus (WHO, 2005). Diante disso, torna-se necessário conduzir vigilância e estudos epidemiológicos abrangentes sobre a IA em todo o território nacional. Isso é crucial para rastrear e controlar linhagens virais com potencial para se tornarem um importante problema zoossanitário. Uma das maneiras de realizar essa vigilância mais abrangente é por meio da vigilância ambiental, que inclui a monitorização de águas residuais.

1.2 Características gerais da doença de Newcastle

A doença de Newcastle (DNC) é considerada uma doença viral com distribuição mundial, sendo principalmente endêmica em países do terceiro mundo e em desenvolvimento, onde a agricultura é a principal fonte de renda (Ganar K, *et. al*, 2014). A DNC também pode ser referida como doença de Ranikhet, nome da cidade na Índia onde a doença teve sua origem. O nome da enfermidade deriva de suas primeiras detecções na história: a primeira ocorreu em 1926 na Indonésia (Kaleta E; Baldauf, 1988), seguida pela segunda detecção em Newcastle upon Tyne, na Inglaterra (Doyle, 1927; Kraneveld, 1926). No entanto, surtos também ocorreram e continuam a acontecer em diversos países, como Austrália, Coreia, Sri Lanka e Japão (Ganar K. *et. al*, 2014). A doença permanece ativa em todo o mundo, com casos recentes registrados em Camarões, Nigéria e Israel, e também com casos positivos em pinguins.

No Brasil, o controle da DNC é oficialmente conduzido pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) e é considerada uma doença exótica na avicultura brasileira, mas de grande risco (Oliveira Junior *et al.*, 2003). Juntamente com a IA, a DNC é considerada devastadora em relação às doenças de aves de criação. Surtos dessa doença em plantéis comerciais avícolas resultam em severas perdas econômicas, uma vez que quase 100% das aves infectadas morrem, e o índice de transmissão também é elevado (Paulillo, A.C. *et al.*, 2000). À vista disso, a DNC é atualmente considerada a doença de maior impacto econômico entre todas as doenças animais, devido aos gastos com erradicação, custos com vacinas e prejuízos decorrentes dos surtos (Alexander, D.J., 2003).

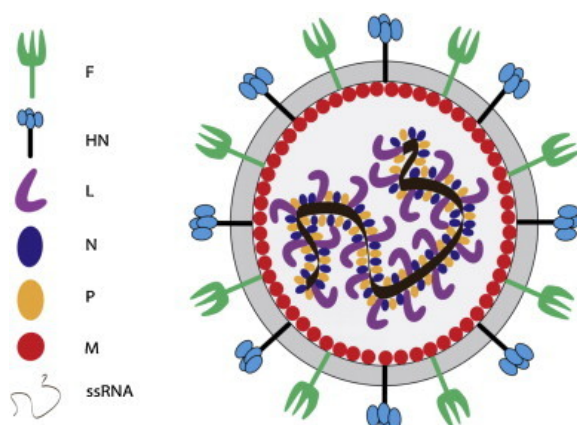
1.2.1 Características específicas do vírus de Newcastle

A DNC é considerada uma zoonose de classe 2, podendo ser transmitida aos humanos. No entanto, a infecção não é grave e não há relatos de transmissão entre humanos. É causada

por um vírus pertencente ao Gênero *Avulavirus* e à Família *Paramyxoviridae*, subfamília *Paramyxovirinae* (Brown *et al.*, 1999), sendo também chamado de Paramixovírus aviário sorotipo 1 (APMV-1) (Flores M.L., 2006). Trata-se de um vírus de RNA de sentido negativo, fita simples e não segmentado (de Leeuw; Peeters, 1999; Krishnamurthy; Samal, 1998; Phillips *et al.*, 1998). O genoma do RNA desse vírus possui 15.186 bases e seis genes que codificam 6 proteínas estruturais, na direção de 3' 5', respectivamente: nucleoproteína, fosfoproteína, matriz, fusão, hemaglutinina-neuraminidase e proteína grande (Figura 5) (Chambers *et al.*, 1986; Wilde *et al.*, 1986). No total, foram descritos 9 sorotipos de Paramixovírus aviários, sendo eles: APMV-1 a APMV-9. Houve registro de patologias em aves domésticas com estirpes de vírus dos sorotipos APMV-2, APMV-3, APMV-6 e APMV-7. No entanto, o APMV-1 é o de maior importância e ocorrência (Flores M.L., 2006).

O vírus de Newcastle (NDV) é um vírus envelopado que possui cerca de 200-300 nm de diâmetro. Ele segue a chamada “regra do seis”, o que significa que a replicação viral é mais eficaz quando as sequências de nucleotídeos nos genomas de cada tipo de cepa são múltiplos de 6. Isso ocorre porque a proteína do nucleocapsídeo se liga a seis nucleotídeos. Assim, é de suma importância para a replicação do genoma viral a encapsulação de 6 nucleotídeos na extremidade 3' por esta única proteína do nucleocapsídeo (Ganar K. *et. al*, 2014).

Figura 5: Diagrama esquemático da estrutura do vírus da doença de Newcastle. Demonstração das hemaglutininas, neuraminidasas, proteína de matriz, fosfoproteína, proteína de fusão e proteína polimerase 'large'.



Fonte: Ganar K, Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus*, 2014.

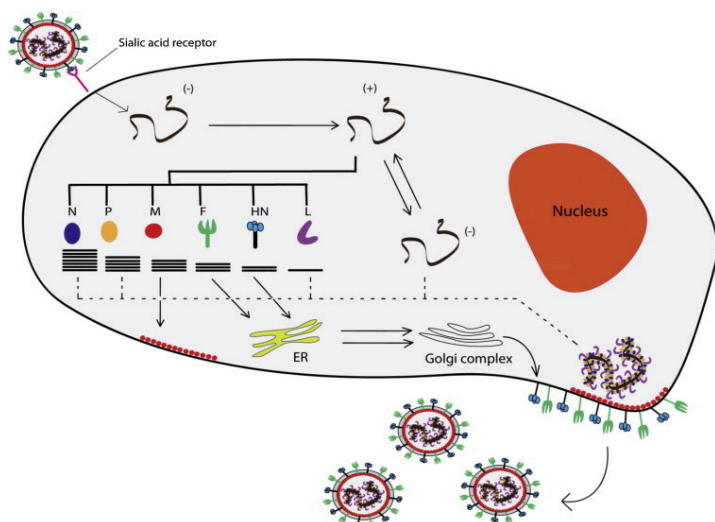
O genoma do NDV consiste em um líder de 55 nt em sua extremidade 3' e um reboque de 114 nt em sua extremidade 5', gerando genes essenciais que codificam o nucleocapsídeo

(N). O RNA genômico (Lamb; Parks, 2007), a proteína de matriz (M), a fosfoproteína (P), a proteína de fusão (F), a proteína hemaglutinina neuraminidase (HN) e a proteína polimerase grande (L) (Ganar K. *et. al*, 2014). Eles estão dispostos na seguinte ordem: 3'-N-P-M-F-HN-L-5'.

A proteína do nucleocapsídeo se liga ao RNA genômico formando o núcleo do nucleocapsídeo; já as proteínas P e L formam um complexo ribonucleoproteico funcional, tanto em virions quanto em células infectadas (Huang Z. *et. al*, 2003). O gene P codifica três proteínas: P, W e V, e a proteína da matriz parece ser responsável pela montagem e o brotamento do vírus (Pantua *et al.*, 2006). O F e o HN, que são antígenos neutralizantes de vírus, são responsáveis pela ligação do vírus à célula hospedeira (Ganar K. *et. al*, 2014). Duas proteínas adicionais são produzidas, V e W; no entanto, não possuem funções conhecidas e específicas. No início e no final de cada gene estão conservadas as sequências de controle transcricional chamadas de genestart: 3'-UGCCCAAUCU/CU-5' e o gene-end: 3'-AAU-CUUUUUU-5' (Huang Z. *et. al*, 2003).

O NDV ataca células do epitélio respiratório ligando-se a compostos com ácido siálico e, normalmente, a infecção (quando o vírus se funde na célula hospedeira) independe do pH e, após a entrada na célula hospedeira o genoma se transcreve em mRNA de sentido positivo que se traduz em proteínas virais (Figura 6) (Ganar K. *et. al*, 2014). Assim, o RNA de sentido negativo é então envolvido em proteínas N, P e L para formar o nucleocapsídeo que é montado com matriz e glicoproteínas de superfície e liberado da célula hospedeira (Ganar K. *et. al*, 2014).

Figura 6: Representação esquemática da replicação do vírus da doença de Newcastle. Inclui a entrada do vírus na célula hospedeira, transcrição do genoma em mRNA, tradução em proteínas N, P, L, F, HN e M, formação subsequente de hemaglutininas e neuraminidases, e o genoma viral, culminando na posterior liberação do vírus.



Fonte: Ganar K, et al. Newcastle disease virus: current status and our understanding, 2014.

1.2.2 Transmissão do NDV

Esse vírus infecta aves domésticas e selvagens, como galinhas, perus e pombos, sendo o último, um ótimo transmissor da doença, sendo que os sintomas variam de espécie para espécie (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009). A transmissão da doença ocorre por contato direto entre as aves, como aerossóis, secreções respiratórias, secreções oculares e fezes de aves infectadas (via fecal-oral). Além disso, pode ocorrer transmissão indireta (alimentos, equipamentos, materiais, veículos, vestuários contaminados e até mesmo a carcaça do animal infectado pode transmitir a doença). As aves consideradas reservatórios da doença são: aves silvestres e ornamentais, com destaque aos psitacídeos, que podem eliminar o vírus por mais de um ano; além disso, as aves vacinadas são consideradas como reservatórios da doença, já que, quando infectadas, não apresentam sintomas, mas podem transmitir o vírus (Estado de São Paulo, 2015). Nos humanos, a doença pode causar conjuntivite transitória.

1.2.3 Patogenicidade da doença

A doença é altamente contagiosa, sendo seu período de incubação cerca de 21 dias (Estado de São Paulo, 2015). Sua patogenicidade é dependente da virulência da cepa infectante, podendo variar em patogenicidade alta (amostra velogênica), patogenicidade intermediária (amostra mesogênica) e patogenicidade baixa (amostra lentogênica) (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009). Em galinhas suscetíveis, o surto da doença costuma ser grave,

com cerca de 100% das aves infectadas, desde as primeiras horas de infecção e em até 72 horas sem apresentar sinais clínicos (de acordo com a cepa).

A patogenicidade alta, causada pela cepa velogênica (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009) tem um período de incubação menor que 21 dias (Estado de São Paulo, 2015) e pode ser dividida em duas formas de manifestações clínicas, são elas:

- “Doença de Doyle” ou Viscerotrópico Velogênico: é a cepa mais agressiva da doença, causando doença severa e fatal, sendo seus principais sintomas iniciais: diarreia esverdeada e lesões hemorrágicas (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009), anomalia nos ovos, cianose e, morte súbita.

- “Forma de Beach ou Neurotrópico Velogênico: também é uma cepa agressiva que provoca problemas respiratórios sendo, espirros, corrimento nasal, inchaço da cabeça e face, fraqueza (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009) edema na cabeça, congestão e hemorragia da mucosa traqueal e faringe, úlceras e/ou necrose e tecidos linfóides da parede intestinal (Estado de São Paulo, 2015) chegando a tremores musculares e, finalmente, à morte, que pode chegar a 100% das aves infectadas.

A patogenicidade intermediária, acarretada pela cepa mesogênica ou “forma de Beaudette”, causa sintomas respiratórios leves nas aves, podendo causar leves sintomas nervosos também, no entanto, a mortalidade é reduzida e mais comum em aves jovens (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009). Já a patogenicidade baixa, causada pela cepa lentogênica, ou “forma de Hittchner” é utilizada para vacinas e, podem causar apenas sintomas respiratórios brandos como reação da vacina. Há ainda, um tipo não patogênico conhecido como entérico assintomático, também utilizado para esquema vacinal, (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009) mas pode causar mortalidade variável de 10 a 100%, as aves infectadas apresentam diarreia, depressão e sinais neurológicos (Estado de São Paulo, 2015).

Para definir a patogenicidade ou não de um vírus são seguidas certas normas internacionais, principalmente pela OIE (Organização Internacional de Saúde Animal) em que diz: “A doença de Newcastle é uma doença infecciosa das aves causada por um Paramyxovirus aviário do sorotipo 1 (APMV-1), que apresenta um dos seguintes critérios de virulência: a) o vírus tem um índice de patogenicidade intracerebral maior ou igual a 0,7 em pintos de um dia; ou b) a presença de múltiplos aminoácidos básicos (três resíduos de arginina ou lisina entre os resíduos 113 e 116) é demonstrada no vírus na porção C-terminal da proteína F2 e fenilalanina no resíduo 117, que é a porção N-terminal da proteína F1” (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009). Sabendo a patogenicidade ou não de um vírus, é possível realizar uma barreira sanitária nos países, principalmente no que se refere ao

comércio avícola, que, se afetado, gera prejuízos econômicos drásticos pela mortalidade das aves (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009).

As cepas patogênicas possuem múltiplos aminoácidos básicos no sítio de clivagem da glicoproteína de fusão, com os aminoácidos arginina ou lisina nas posições 113-116 e fenilalanina na posição 117 (Alexander, D.J., 2003). Toda essa composição é necessária para que a ativação enzimática aconteça, visto que ela ocorre via intracelular por furina no complexo de Golgi; a proteína Fo é ativada em F1 e F2 pela furina, permitindo assim, a infectividade aos novos vírions procederem a fusão e a penetração. Todas as diferenças constituintes dos vírus e suas respectivas patogenidades ocorrem pela clivagem ou não da proteína de fusão, que permite a fusão do vírus à célula; o APMV-1 é envelopado e, para infectar uma célula, é extremamente dependente da integridade do próprio envelope para promover a penetração na célula-alvo (Alexander, D.J., 2003).

O APMV-1 infecta cerca de 136 espécies de aves selvagens e ornamentais também (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009), sendo, as mais suscetíveis, às galinhas, principalmente às cepas velogênicas (patogenicidade alta), os perus são mais resistentes e as aves silvestres apresentam principalmente as cepas lentogênicas (baixa patogenicidade). Os hospedeiros mais comuns são os columbiformes (Estado de São Paulo, 2015)

1.2.4 Prevenção da DNC

A DNC pode ser prevenida por vacinas, já existentes no mercado; algumas são fabricadas com vírus ativado e outros inativados, além disso, estão disponíveis vacinas termoestáveis (Ganar K. *et al.*, 2014), que facilitam no transporte do país de fabricação para o país de importação e na preservação das mesmas.

Atualmente, existe vacina contra a doença de Newcastle disponível no mercado avícola, é uma vacina eficiente e o Brasil opta por vacinar as aves que chegam ao país. O gene da doença de Newcastle é considerado um gene fácil de manipular usando o sistema de genética reversa (Bukreyev; Collins, 2008; Huang *et al.*, 2003; Krishnamurthy *et al.*, 2000; Peeters *et al.*, 2001). Os tipos de vacinas mais utilizados são as vacinas vivas atenuadas e bivalentes e a cepa mais utilizada para as vacinas são as cepas lentogênicas. O sucesso das vacinas contra a doença de Newcastle se devem à: ótima resposta imune celular e humoral à DNC e o fato de que ela não se integra ao genoma do hospedeiro, pois se replicam no citoplasma do hospedeiro e apresenta menor recombinação genética (Ganar K, *et al.*, 2014).

1.3 Controle da Influenza Aviária e Doença de Newcastle.

O NDV e a IA, similar a outros tipos de vírus respiratórios, podem ser introduzidos nos países de diversas maneiras, como: trânsito de passageiros entre países, importação de animais e material genético, assim como produtos biológicos (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009) esse tipo de transmissão pode ser controlada pelo país que recebe o importado, e é o que o Brasil faz. O país toma medidas cautelares para isso: todas as aves de plantel, reprodutoras e de postura comercial, devem realizar a vacinação preventiva da DNC, além disso, os estabelecimentos avícolas que enviam aves e ovos férteis para locais de venda com aglomeração são obrigados a alojar apenas aves vacinadas (Estado de São Paulo, 2015). Em alguns estados brasileiros, no entanto, somente aves matrizes são vacinadas, para que a imunidade seja transmitida para a prole (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009).

No Brasil, existe um Programa específico para o controle das duas doenças avícolas: o chamado Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que estabelece os critérios mínimos para a segurança e biossegurança referente a essas duas doenças e também determina os critérios e procedimentos de detecção e prevenção contra as enfermidades (BR, GOV., 202-). Essa vigilância possui 3 principais objetivos: detecção precoce de casos de IA e DNC em aves domésticas e silvestres, demonstrar a negatividade dos testes das aves para fins comerciais e monitorar as cepas virais existentes, principalmente da IA para estabelecer estratégias de prevenção (BR, GOV. , 202-)

No entanto, existe uma outra maneira em que os vírus podem chegar ao país já citada: pelas aves migratórias, e essa maneira de entrada do vírus no país é difícil de ser controlada, visto que, é claramente difícil identificar as aves que chegam ao Brasil pelas rotas migratórias. As aves se deslocam antes do inverno boreal, do ártico para a América do Sul, quando chegam na América, preferem locais úmidos, tais como praias, estuários, manguezais, áreas alagadas e áreas com alta concentração de alimentos, como o Pantanal Matogrossense. O que implica um possível alerta, é a interação de aves residentes do país com aves migratórias transmissoras de doenças, o que implica em grande risco de disseminação de doenças para o plantel aviário em si.

Dessa forma, faz-se necessário a pesquisa sobre as mais variadas formas de rastreamento desse vírus que pode chegar ao país pelas rotas migratórias das aves. Para a prevenção da doença no território nacional, entre as aves nacionais, as medidas tomadas são as seguintes: atendimento a todas as aves com suspeita de infecção, controle de trânsito interno de médicos veterinários e o controle de produtos biológicos (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009).

Além disso, a fim de evitar a propagação do vírus, seja ele IA ou NDV, caso este seja positivado em alguma amostra de ave, a notificação da infecção é obrigatória, em qualquer espécie de ave, o estabelecimento é investigado e a movimentação das aves e dos produtos advindos é bloqueada, sacrifício preventivo de todas as aves sem que envolva a disseminação de sangue (a fim de evitar a propagação do vírus no local) do estabelecimento infectado, instituição de zona de proteção que pode chegar à vários metros e vigilância ao redor do estabelecimento contaminado que inclui a limpeza de todas as instalações com desinfetantes específicos, descarte de todos os materiais que entraram em contato com as aves, principalmente as camas de aviário (material que serve de leito para os animais), além disso, deve-se aplicar inseticidas para a eliminação de vetores como insetos, roedores, pássaros (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009).

Existem alguns tipos de vacinas para esse vírus, seja elas com vírus vivo ou morto, os protocolos de vacinação são aplicados globalmente, não só no Brasil. Os frangos que nascem em plantéis são vacinados nos primeiros dias de vida por via intra-ocular seguida de outra dose 14 dias após a aplicação da primeira (Ganar K. *et. al*, 2014).

A infecciosidade do vírus é destruída por detergentes e desinfetantes, (devido seu envelope), que já são utilizados na avicultura em toda a limpeza dos plantéis, no entanto, a eficiência é reduzida quando os vírus já estão protegidos com matéria orgânica (Secretaria de Defesa Agropecuária, 2009).

1.4. Análise de águas residuais como vigilância epidemiológica e ambiental

Nos últimos anos, o conceito de *One Health* tem sido discutido e direcionado para ações que visem criar estruturas e integrar sistemas com capacidades para que se possa coletivamente prevenir, prever, detectar e responder melhor às ameaças à saúde. Em síntese, essa iniciativa visa melhorar a saúde dos seres humanos, animais, plantas e meio ambiente, contribuindo para o desenvolvimento sustentável (Who, 2022).

De maneira geral, atualmente, a maneira mais utilizada para realizar o monitoramento da ocorrência de vírus se dá por meio da vigilância clínica, que monitora os pacientes em contato direto com eles. No entanto, esse tipo de vigilância exige muitos recursos e, assim, identifica surtos muito tardiamente, visto que ela detecta a data do teste e não a data de quando a infecção viral começou (Mercier, E, *et. al*, 2022). Além disso, a vigilância clínica é realizada em locais sentinela selecionados, com amostragem limitada, justamente porque esse

tipo de vigilância é dispendiosa, demorada e trabalhosa, o que pode atrasar resultados e gerar uma pequena epidemia (Zheng, X., *et al*, 2023).

Relacionada ao fator ambiental, esse tipo de epidemiologia permite a obtenção de informações sobre a ocorrência de doenças transmissíveis nas comunidades. Além disso, possibilita que, a partir de seus resultados, seja uma importante ferramenta na detecção de doenças que acometem a população quase em tempo real para o controle de doenças infecciosas (Zheng, X. *et al*, 2023).

O monitoramento de amostras de esgoto tem sido amplamente utilizado atualmente para a detecção de drogas, doenças gastrointestinais e bactérias (Randazzo, W. *et. al*, 2020). Mais recentemente, foi considerada uma ferramenta importante para o estudo de vírus relevantes em determinadas áreas (Santiso-Bellón *et. al*, 2020). Com essa capacidade de detecção, as análises de águas residuais (WWS) são consideradas, atualmente, uma ferramenta de alerta precoce para o monitoramento e a tendência de infecção de diversas doenças virais, como enterobioses (Randazzo, W. *et. al*, 2020), rotavírus (Santiso-Bellón *et. al*, 2020), vírus da poliomielite e vírus das hepatites, como a Hepatite E (Cuevas-Ferrando Enric *et. al*, 2020). Foi relatado também como bem-sucedido na detecção da gripe, com reflexos em campus universitários e escolas dos EUA (Wolfe *et al.*, 2022; Wolken *et al.*, 2023), correlacionando-se com a vigilância clínica comunitária no Canadá (Mercier *et al.*, 2022). Esse tipo de vigilância foi considerado um dos pilares para a erradicação da poliomielite, visto que conseguia detectar os locais com os principais focos de contaminação com o vírus (Humayun Asghar, 2014).

A corrente pandemia de COVID-19 demonstrou o imenso valor da análise de amostras derivadas de estações de tratamento de esgoto para identificar a circulação do SARS-CoV-2 no país, permitindo estimar a quantidade de pessoas infectadas (Chernicharo, 2021). Foi justamente devido ao SARS-CoV que esse tipo de pesquisa foi rapidamente desenvolvida, dada a eficácia na detecção de coronavírus (Deng *et al.*, 2022; Morvan *et al.*, 2022; Zheng *et al.*, 2022b). Assim, a WWS pode indicar uma descoberta antecipada, antes mesmo do vírus ser registrado na cidade. De acordo com Randazzo *et al* (2020), amostras positivas de águas residuais para COVID-19 foram detectadas cerca de 12 a 16 dias antes da declaração de casos em cidades da Espanha. Isso significa que a detecção precoce do RNA de certos vírus pode servir de alerta sobre um perigo iminente, proporcionando tempo valioso para a tomada de decisões e, assim, retardando a propagação de certas doenças, protegendo a população de um possível surto (Randazzo, W. *et. al*, 2020). Consequentemente, a vigilância ambiental entra

como um complemento fortíssimo, podendo até ocorrer a substituição (Mercier, E. *et al.*, 2022) da vigilância clínica.

De acordo com Chan *et al.* (2011), o RNA viral da gripe pode ser detectado em amostras fecais de pacientes infectados, visto que é excretado em altas taxas nas fezes (Mercier, E. *et al.*, 2022), sugerindo que o vírus permanece detectável mesmo em ambiente fecal, como nas águas residuais. Também foi demonstrado que o InFA é extremamente persistente em águas residuais e em rios (Domanska-Blicharz *et al.*, 2010) e pode manter sua capacidade infecciosa por períodos prolongados, dependendo da salinidade, pH e temperatura (Webster R. *et al.*, 1978). Foi inclusive detectado em amostras de águas residuais na cidade de Hong Kong, onde 1182 amostras foram analisadas. O vírus H5N1, em particular, é encontrado e liberado em ambientes aquáticos por meio das fezes de patos e, consequentemente, de aves infectadas. De acordo com um estudo, nos patos selvagens, o vírus H5N1 replica-se preferencialmente em células que revestem o trato intestinal e, por isso, é excretado em altas concentrações nas fezes dos animais (Webster, R. G., 1978). Além disso, o vírus H5N1 mantém sua infectividade no material fecal por pelo menos 30 dias a 4°C e por 7 dias à 20°C (Lénès, D. *et al.*, 2010), o que demonstra que a detecção desse vírus na análise de águas residuais é eficaz. Ainda de acordo com Lénès *et al.* (2010), em uma pesquisa na qual o vírus H5N1 foi suspenso em amostras que passariam por processos de clarificação, o vírus permanece detectável. Portanto, caso a amostra de esgoto bruto estivesse contaminada, ele seria detectado posteriormente na PCR. Alguns estudos relataram que o IAV possui preferência pelas frações sólidas em comparação com as frações sobrenadantes (Mercier *et al.*, 2022; Wolfe *et al.*, 2022).

Detectar o vírus logo no início da sua chegada a uma região é de extrema importância, especialmente no contexto de doenças aviárias como a gripe aviária e a doença de Newcastle. Essas doenças são altamente perigosas e letais para os plantéis avícolas. A detecção precoce permite que as granjas se preparem de forma mais rigorosa para evitar o contato do vírus com seus animais, o que, por sua vez, evita prejuízos econômicos e de saúde pública. Portanto, a análise desse tipo de vírus em águas residuais é de extrema importância, já que as aves podem eliminar o vírus nas estações de tratamento, que muitas vezes são áreas abertas ou até mesmo em locais públicos. Consequentemente, as excreções das aves podem ser arrastadas pela chuva e chegar às estações de esgoto.

É importante ressaltar que o controle da entrada do vírus no país se dá por meio de testes para a doença apenas em aves que entram e saem do Brasil, assim como naquelas criadas em granjas. No entanto, controlar os vírus em aves migratórias, que são os principais

transmissores dos patógenos, é extremamente difícil devido à sua liberdade de movimento. Portanto, a análise de águas residuais para detectar a presença desses vírus é de extrema importância para rastrear e monitorar esses patógenos preocupantes. Em resumo, destaca-se que o esgoto tem sido uma via de transmissão para vários patógenos humanos, e estudar a presença do vírus da IA e da doença de Newcastle contribui para a vigilância ambiental desse importante patógeno tanto para humanos quanto para animais.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TEMA

Os vírus Influenza A e Newcastle são considerados agentes altamente patogênicos, associados a elevadas taxas de mortalidade. Portanto, representam uma significativa preocupação do ponto de vista econômico e comercial, especialmente no contexto das criações avícolas e granjas comerciais. A análise desses vírus assume uma importância crucial devido à sua capacidade de causar danos substanciais. A vigilância ativa desses vírus no país é essencial para garantir a segurança e a qualidade, uma vez que todas as aves destinadas à exportação são submetidas a testes para ambas as doenças e recebem vacinação contra a Doença de Newcastle. No entanto, à semelhança da maioria dos países, se não todos, que também adotam medidas de proteção contra esses agentes altamente letais, as chances de introdução de aves doentes no país são reduzidas, dado que estas também passam por testes ao chegar.

Dessa forma, a principal capacidade de transmissão recai sobre as aves migratórias silvestres, que constituem vastos reservatórios desses vírus e chegam ao país durante o período entre a primavera e o outono. Elas podem contaminar aves de subsistência e, subsequentemente, roedores, que por sua vez podem chegar a granjas e plantéis, resultando na contaminação de um lote inteiro. A vigilância ativa em aves migratórias apresenta desafios, uma vez que são animais livres e controlar sua entrada no país é complexo.

Uma abordagem eficaz para a vigilância ativa é por meio do monitoramento de águas residuais, coletadas em toda a extensão de uma cidade e encaminhadas para estações de tratamento. As aves podem defecar em áreas comuns que, ao serem lavadas, acabam sendo direcionadas para o sistema de esgoto, o qual, por sua vez, deságua na Estação de Tratamento de Esgoto (ETE). Nesse ambiente, as aves podem defecar nos próprios reservatórios de água, que frequentemente são descobertos.

Diante da notificação do MAPA em 2023 sobre um alerta zoonosológico devido à positividade de IA em aves no litoral do país, tornou-se imperativo intensificar a vigilância ativa e reforçar o rastreamento desse vírus no território nacional.

3. OBJETIVOS

O intuito do projeto consistiu em identificar e monitorar o vírus da Influenza aviária e o vírus Newcastle em amostras de esgoto coletadas em São José do Rio Preto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS.

4.1 Local de Estudo, Infraestrutura e Equipamentos.

O local utilizado para o estudo é o Laboratório de Estudos Genômicos, localizado na UNESP de São José do Rio Preto. Ele possui infraestrutura adequada e necessária para a realização do estudo. O local possui salas adequadas para a etapa de clarificação da amostra, com cabines de segurança biológica de Classe II para manter toda a segurança mediante a amostra recebida. Além disso, o laboratório conta com os reagentes necessários para a etapa de extração de RNA, freezer -80° para o armazenamento das amostras. Além de salas para as etapas de PCR, também possui equipamentos e reagentes para PCR em tempo real. Salienta-se que o laboratório possui vasta experiência em pesquisas com análises em virologia.

4.2 Tipo de Amostragem

As amostras foram coletadas pela ETE (Estação de Tratamento de Esgoto), pertencente ao SEMAE, da cidade de São José do Rio Preto, localizada perto da confluência do córrego de São Pedro com o rio Preto. A Estação coleta 93,48% do esgoto do Município e 99,52% do esgoto urbano, e assim, 100% do esgoto coletado é tratado (SEMAE, 2023). As etapas de tratamento são divididas em seis: logo que o esgoto bruto chega na estação, ele passa pela etapa de pré-tratamento, que engloba o gradeamento grosseiro, gradeamento fino e desarenador, para retirar resíduos sólidos de maior tamanho e areia (SEMAE, 2023) e é ao final dessa etapa que a amostra é recolhida pelos colaboradores. Depois, o esgoto passa pelo reator UASB (Upflow Anaerobic Sludge Blanket – Reator anaeróbio de fluxo ascendente)

também chamado de reator anaeróbio, composto de iodo, para o consumo de matéria orgânica por bactérias presentes no lodo. Após esse processo, o efluente passa pelo filtro biológico aerado, posterior decantação e desinfecção, para ser devolvido ao Rio Preto. A eficiência de tratamento obtida ultrapassa 98%, principalmente no que se refere ao grau de pureza da água que é devolvida ao rio.

As amostras utilizadas no projeto possuem 500 mL de esgoto bruto, e foram coletadas semanalmente desde a primeira semana de setembro de 2022 até a última semana de agosto de 2023, a partir da chegada à estação de tratamento (0h), somente tendo passado pelo processo de gradeamento grosseiro e fino (retirada de grandes materiais sólidos e areia); e foi realizada por um amostrador automático refrigerado HACH Sigma SD900 AWRS (HACH, Loveland, CO, EUA), com programa de amostragem ajustado à vazão de entrada (Martins RM, *et. al*, 2022).

Após a coleta, o material foi mantido a 4°C em isopor e gelo (Randazzo, W. *et. al*, 2020) e enviado imediatamente ao Laboratório de Estudos Genômicos - UNESP/IBILCE pelos servidores da própria Estação de Tratamento. A amostra então, passou pelo processo de clarificação, para retirar os resíduos em suspensão e padronizá-las no conteúdo; neste processo, 37 mL de amostra foi pipetada em 6 tubos cada e levadas até a ultracentrífuga na rotação de 3000 Xg por 20 minutos à 8°C. Após esse processo, o pellet formado foi descartado em solução com detergente, visto que, nesse momento, ele representa apenas resíduos sólidos e o sobrenadante é novamente separado em 6 outros tubos, que são centrifugados novamente na rotação de 41.000 Xg por 3 horas à 3°C, para que o pellet com partículas virais seja formado. Passada as 3 horas, o sobrenadante foi descartado, e o pellet, foi suspenso na solução de Tris/EDTA (Tris-HCl [10mM] e EDTA [1mM]) pH 8.0 com o objetivo de estabilizar a amostra e inibir qualquer atividade enzimática ali presente e depois, foram armazenados à -80°C até a etapa de extração do RNA.

4.3 Extração do RNA

A etapa de extração do RNA para a obtenção do RNA total da amostra foi realizada pelo método TRIzol® Reagent (Invitrogen®) com a utilização de 250 µL (microlitros) de amostra e 750 µL de TRIzol, que foram homogeneizados por inversão e incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Após este processo, 200 µL (microlitros) de clorofórmio (Merck Millipore®) foi adicionado com posterior homogeneização por inversão e incubação por 3 minutos e, posteriormente, centrifugação da amostra à 14.000 XG por 15 minutos a 4°C;

sendo possível, após este processo, visualizar a parte translúcida que representa o RNA do DNA (parte rosada). Ao final da centrifugação, a região onde se encontra todo o RNA foi transferida para outro tubo onde foram adicionados 500 µL de isopropanol absoluto (Merck Millipore®) e homogeneizada novamente por inversão e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Após todo esse processo, as amostras foram submetidas a uma centrifugação novamente, agora à 14.000 Xg por 20 minutos a 4°C e, ao final desse processo, o pellet de RNA estava aderido à parede do tubo e o descarte de todo o líquido restante foi realizado; assim, 1mL de etanol DEPEC 75% (Merck Millipore®) foi adicionado e centrifugado a 4°C por 10 minutos a 10.000 rpm. Após esse processo, todo o líquido é descartado e o tubo, com o pellet de RNA é secado a vácuo e ressuspensionado em 30 µL de água DEPEC (Sigma Aldrich®), quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific®) e armazenado à -80°C.

4.4 RT-qPCR para detecção do vírus IA, Newcastle e PMMoV.

Após a etapa de extração e quantificação do RNA, foi realizada a análise de RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real) para os dois vírus: Newcastle e Influenza A, com o controle interno de recuperação PMMoV (*Pepper mild mottle virus*).

Para a detecção do Influenza A, foi utilizado o Kit AgPath-ID™ One-Step, no Quant Studio. O mix utilizado foi composto dos seguintes iniciadores e sondas: buffer (12,5µL), primer M+25 (20µm) na quantidade de 0,5µL, primer M-126 (20µm) na quantidade de 0,5µL, sonda fan M+64 (6µm) na quantidade de 0,5µL, enzima (1µL) e H₂O free nuclease (5µL), sendo que, o conjunto de iniciadores de PCR e a sonda de hidrólise foram projetados para uma região conservada em todos os genes da matriz do vírus influenza tipo A (Spackman *et al.*, 2002) ou seja, os primers não são específicos para H5N2. Ao fim, o mix possuía 20µ e era então adicionado 5µL de amostra, totalizando 25µL. O controle positivo da análise foi 5µ de RNA de H1N1 e o controle negativo H2O nuclease free. Utilizou-se a seguinte ciclagem no Quant-Studio: 45°C por 10 minutos (transcrição reversa), 95°C por 5 minutos (inativação da enzima transcriptase reversa) e posteriores 45 ciclos de 94°C por 10 segundos, 57°C por 30 segundos e, ao final, 72° C por 10 segundos (etapa de anelamento).

Tabela 1: sequências de primers e sondas utilizadas na RT-qPCR de Influenza A.

Especificidade	Primers/Sonda	Sequência 5' 3'
Influenza 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

Fonte: Adaptado de Spackman et al. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. 2002.

O controle interno de recuperação foi realizado juntamente com a análise da Influenza A, na mesma placa e com as mesmas amostras. O PMMoV: *Pepper mild mottle virus* é um vírus que se hospeda em *Capsicum spp.* (pimentas e pimentões) e é considerado um indicador da qualidade de águas residuais, visto que as moléculas do RNA desse vírus estão nas fezes humanas em altas concentrações. devido à alimentação da população ser composta de temperos com pimentões.

De acordo com D'Aoust *et al* (2021), Wolfe, MK *et al* (2021), Bivins, A. *et al* (2021), Nagarkar, M. *et al* (2022), Zhan, Q. *et al* (2022), LaTurner, ZW *et al*, (2021), a Influenza A foi normalizada utilizando o PMMoV para contabilizar o conteúdo fecal humano nos sólidos das águas residuais, visto que, o PMMoV é recomendado e utilizado como fator de normalização e identificação de tendência devido a sua estabilidade em águas residuais e sua baixa variação temporal em relação à concentração. De fato, analisando a presença do PMMoV em águas residuais domésticas é possível monitorar a qualidade e eficiência do tratamento de esgoto (Junqueira, 2014). Para a RT-qPCR do PMMoV, os primers e sondas foram diluídos na concentração de 5µL de primer para 45µL de água DEPEC. Sendo assim, o mix consistia em: buffer (12,5µL), primer PMMoV-R (20µm) na quantidade de 0,5µL, primer PMMoV-F (10µm) na quantidade de 0,5µL, sonda PMMoV-P (10µm) na quantidade de 0,5µL, enzima (1,0µL) e H₂O (5,0µL). Ao final, o mix possuía 20µL e era então adicionado 5µL de amostra, totalizando 25µL. A ciclagem utilizada foi a mesma da Influenza A, visto que os dois eram feitos na mesma placa de RT-qPCR.

Tabela 2: Sequência de primers e sondas utilizados para RT-qPCR do vírus Pepper.

Especificidade	Primer/Sonda	Sequência 5' 3'
<i>Pepper mild mottle virus</i>	PMMoV-R	TTGTCGGTTGCAATGCAAGT
	PMMoV-F	GAGTGGTTTGACCTTAACGTTGA
	PMMoV-P	FAM-CCTACCGAAGCAAATG-BHQ1

Fonte: Kitajima, M. Sassi, HP & Torrey, JR. Pepper Mild Mottle Virus como indicador de qualidade da água. 2018. R: primer reverse; F: primer forward; P: *probe*.

Para a reação RT-qPCR do vírus Newcastle o kit utilizado foi o: KiCqStart- One Step, ReadyMix. O mix consistiu em: buffer 2x mastermix (12,5µL), primer APMV-1M-4100 (10µM) na quantidade de 2,0µL, primer APMV-1M-4220 (10µM) na quantidade de 2,0µL, sonda M+4169 probe (5µM) na quantidade de 0,6µL e H₂O DEPEC (3,9µL); ao final, o mix possuía 21µL e era adicionado à ele, 4µL de amostra extraída, totalizando 25µL. A ciclagem utilizada foi a seguinte: 50°C por 10 minutos, 95°C por 1 minuto e 45 ciclos de 95°C por 10 segundos e 52°C por 1 minuto. O controle positivo utilizado foi a vacina de da doença de Newcastle diluída e controle negativo, H₂O nuclease free, ambos com quantidade de 5µL adicionada.

Tabela 3: Sequência de primers e sondas utilizados para RT-qPCR do vírus Newcastle.

Especificidade	Primer/Sonda	Sequência 5' 3'
Newcastle	APMV-1M-4100	AGT GAT GTG CTC GGA CCT TC
	APMV-1M-4220	CCT GAG GAG AGG CAA TTT GCT A
	M+4169 probe	[FAM] TTC TCT AGC AGT GGG ACA GCC TGC - IBQ

Fonte: Wise Mark G. *et al.* Desenvolvimento de PCR de transcrição reversa em tempo real para detecção de RNA do vírus da doença de Newcastle em amostras clínicas.

Para cada PCR, dos diferentes tipos de vírus, os Cts considerados positivos são os seguintes:

Tabela 4: Ct considerado positivo na etapa de PCR em tempo real.

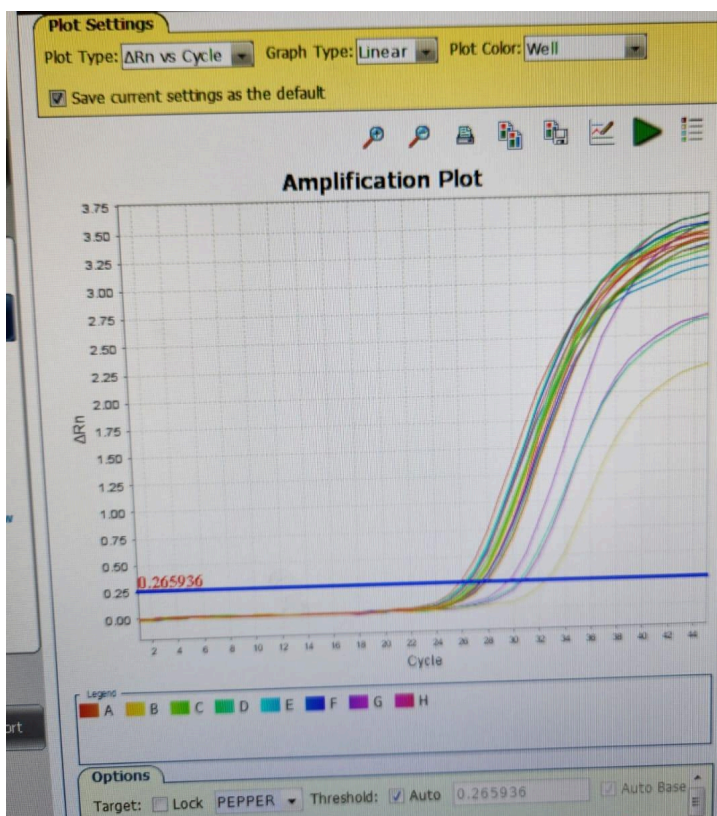
Vírus	Ct considerado positivo
Influenza A	<40
Newcastle	<40
<i>Pepper mild mottle virus</i> (PMMoV)	<40

Fonte: autor

5. RESULTADOS

Um total de 52 amostras, correspondentes ao período de setembro de 2022 a setembro de 2023, constituíram o tamanho da amostragem e foram analisadas quanto à presença ou ausência dos vírus da Influenza Aviária e da doença de Newcastle. A primeira amostra foi coletada em 06/09/2022 e a última em 28/08/2023. Das quais, 52 amostras foram negativas tanto para o InFA quanto para o NDV, demonstrando um resultado satisfatório quanto a detecção do PMMoV. Portanto, todas as amostras, totalizando 100%, negativaram para o IA e para o NDV. Em contraste, 86,53% das amostras testaram positivas para o PMMoV, um vírus de RNA comumente encontrado nas fezes que permite monitorar todo o processo analítico (fase de extração de RNA, transcrição reversa, ausência de inibidores); esse tipo de controle interno não é influenciado por flutuações sazonais ou aspectos sociais (Kitajima, M., 2018).

Figura 7: Curva de amplificação do vírus Pepper em PCR em tempo real. Ele demonstra a positividade do vírus Pepper.



Fonte: autor.

Tabela 5: Presença e ausência do vírus Influenza A, Newcastle e o controle exógeno (PMMoV). Os dados são correlacionados com a data da coleta de cada amostra.

Presença e ausência das amostras				
Amostras	Data da coleta	Influenza A	Newcastle	Pepper mild mottle virus
24T	06/09/2022	Ausente	Ausente	Ausente
25T	12/09/2022	Ausente	Ausente	Ausente
26T	19/09/2022	Ausente	Ausente	Ausente
27T	26/09/2022	Ausente	Ausente	Ausente
28T	03/10/2022	Ausente	Ausente	Ausente
29T	10/10/2022	Ausente	Ausente	Presente
30T	17/10/2022	Ausente	Ausente	Ausente
31T	24/10/2022	Ausente	Ausente	Presente
32T	31/10/2022	Ausente	Ausente	Presente
33T	07/11/2022	Ausente	Ausente	Presente

34T	14/11/2022	Ausente	Ausente	Presente
35T	21/11/2022	Ausente	Ausente	Presente
36T	28/11/2022	Ausente	Ausente	Presente
37T	05/12/2022	Ausente	Ausente	Presente
38T	12/12/2022	Ausente	Ausente	Presente
39T	19/12/2022	Ausente	Ausente	Presente
40T	26/12/2022	Ausente	Ausente	Presente
41T	02/01/2023	Ausente	Ausente	Presente
42T	09/01/2023	Ausente	Ausente	Presente
43T	16/01/2023	Ausente	Ausente	Presente
44T	23/01/2023	Ausente	Ausente	Presente
45T	30/01/2023	Ausente	Ausente	Presente
46T	06/02/2023	Ausente	Ausente	Presente
47T	13/02/2023	Ausente	Ausente	Presente
48T	20/02/2023	Ausente	Ausente	Presente
49T	27/02/2023	Ausente	Ausente	Presente
50T	06/03/2023	Ausente	Ausente	Presente
51T	13/03/2023	Ausente	Ausente	Presente
52T	20/03/2023	Ausente	Ausente	Presente
53T	27/03/2023	Ausente	Ausente	Presente
54T	03/04/2023	Ausente	Ausente	Presente
55T	10/04/2023	Ausente	Ausente	Presente
56T	17/04/2023	Ausente	Ausente	Presente
57T	24/04/2023	Ausente	Ausente	Presente
58T	01/05/2023	Ausente	Ausente	Presente
59T	08/05/2023	Ausente	Ausente	Presente
60T	15/05/2023	Ausente	Ausente	Presente
61T	22/05/2023	Ausente	Ausente	Presente

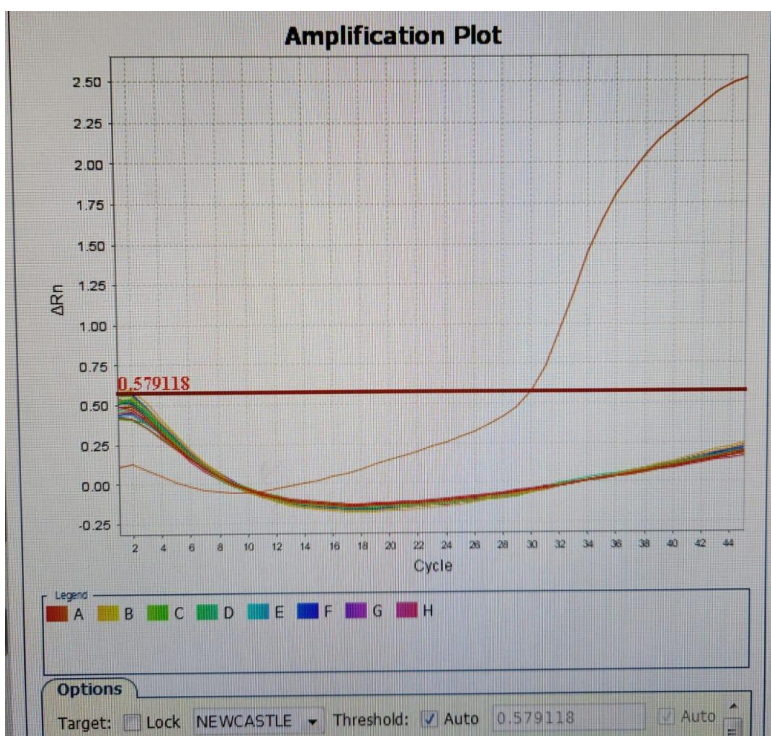
62T	29/05/2023	Ausente	Ausente	Presente
63T	05/06/2023	Ausente	Ausente	Presente
64T	12/06/2023	Ausente	Ausente	Presente
65T	19/06/2023	Ausente	Ausente	Presente
66T	26/06/2023	Ausente	Ausente	Presente
67T	03/07/2023	Ausente	Ausente	Presente
68T	10/07/2023	Ausente	Ausente	Presente
69T	18/07/2023	Ausente	Ausente	Presente
70T	24/07/2023	Ausente	Ausente	Presente
71T	31/07/2023	Ausente	Ausente	Presente
72T	07/08/2023	Ausente	Ausente	Presente
73T	14/08/2023	Ausente	Ausente	Presente
74T	21/08/2023	Ausente	Ausente	Presente
75T	28/08/2023	Ausente	Ausente	Presente

Fonte: autor.

Por mais que o PMMoV seja utilizado como uma referência em águas residuais, visto que está em alta concentração nessas amostras, nem sempre ele está presente, como mostrado na tabela acima. Isso se deve a diversos fatores e pode incluir a baixa carga viral, altamente diluída nas amostras residuais, e/ou algum tipo de estresse na amostra tal como descongelamento adicional do RNA contido nas amostras, que pode dificultar a detecção do PMMoV (Boehm *et al.*, 2023).

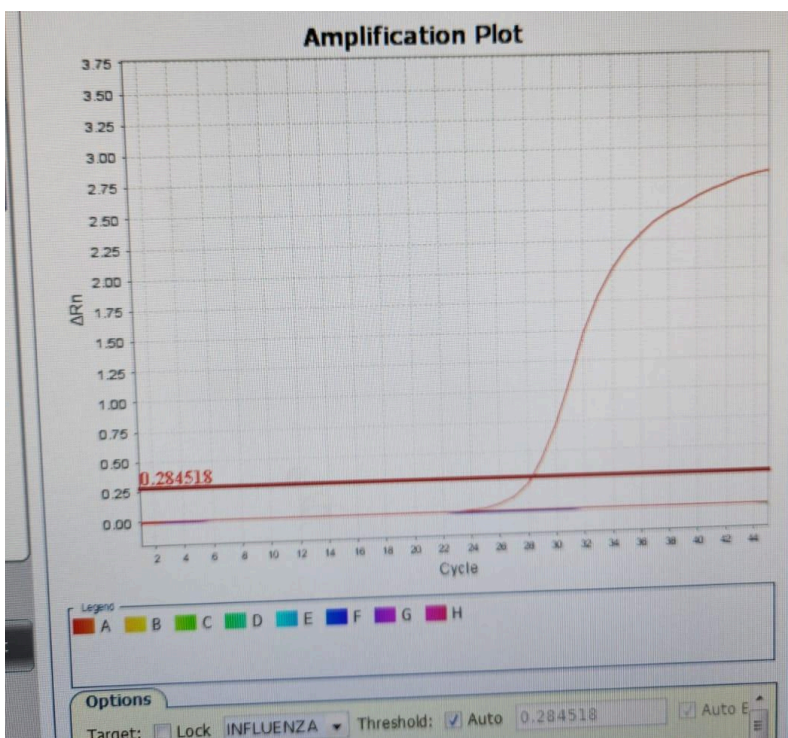
O controle positivo para o vírus Influenza e para o vírus Newcastle teve atividade satisfatória em todas as PCRs realizadas.

Figura 8: Curva de amplificação em uma PCR em tempo real para Newcastle. A curva acima do eixo X estabelecido representa o controle positivo do vírus Newcastle.



Fonte: autor.

Figura 9: Curva de amplificação do controle positivo do vírus Influenza. As linhas retilíneas abaixo do eixo X representam as amostras negativas para o vírus.

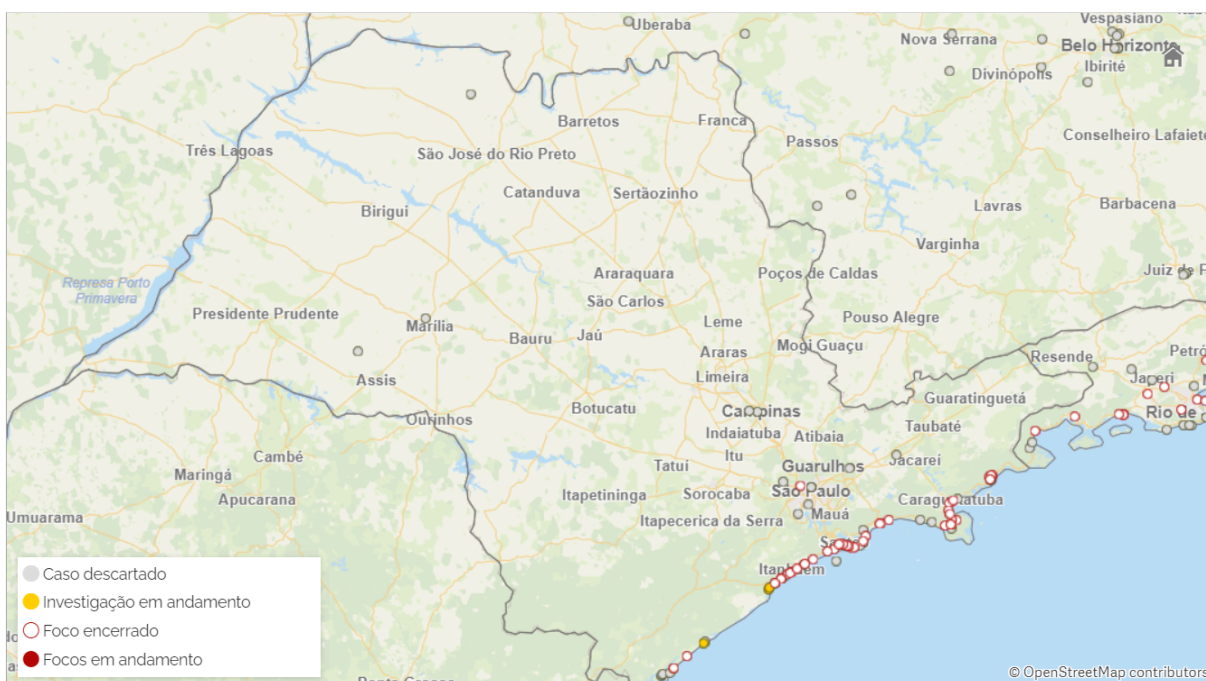


Fonte: autor.

6. DISCUSSÃO

É importante destacar que os dados gerados, os quais indicaram ausência dos vírus da IA e do NDV nas amostras de esgoto da região de São José do Rio Preto, estão em conformidade com a não detecção dessas doenças no entorno da cidade analisada. Segundo o MAPA (2023), até 27 de outubro de 2023, no Brasil, foram confirmados 124 casos de Influenza aviária em aves silvestres, 3 em aves de subsistência ou domésticas, e nenhum em aves comerciais. É importante ressaltar que a maioria dos casos confirmados foi registrada no litoral do país, principalmente nas regiões sudeste e sul, que correspondem à principal rota das aves migratórias. Quanto à doença de Newcastle, em 2023, não foi detectado nenhum caso, sendo que os últimos casos registrados ocorreram em 2006 (BR, GOV., 202-).

Figura 10: Casos de Influenza aviária confirmados no Estado de São Paulo. Demonstração de casos descartados, investigação em andamento, foco encerrado e focos em andamento.



Fonte: Ministério da Agricultura e Pecuária. Investigações de Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves realizadas pelo Serviço Veterinário Oficial. (2022-2023).

Além disso, de acordo com estudos, os InFA, são liberados em fezes em altas taxas, no entanto, por possuírem uma membrana lipídica externa, são encontrados em baixas concentrações em amostras de águas residuais (Mercier, E. *et al.*, 2022). Em geral, a detecção de Influenza A em amostras de águas residuais tem sido escassa (Kevill, JL *et al.*, 2022; Heijnen, L. *et al.*, 2011). Uma das hipóteses para essa baixa detecção, além do tipo do vírus, é a presença de inibidores nas águas residuais, o que afeta o comportamento do RNA do vírus

Influenza (CWN, 2020). Adicionalmente, de acordo com Heijen L *et. al.*, (2011), amostras com ensaios de concentrações virais mostraram que a presença dessas substâncias inibidoras nas amostras de esgoto resulta em baixa detecção dos vírus nessas amostras. Em geral, há uma limitação no sucesso da detecção de IAV em amostras de esgoto (Kevill. J.L *et al*; Wolfe *et al.*, 2022), visto que as concentrações do RNA do vírus são menores.

Em relação ao controle exógeno (PMMoV), nas amostras em que ele resultou negativo, não é possível certificar-se de que não há a presença do vírus Influenza A ou do vírus Newcastle. Tratando-se de um controle, quando este torna-se negativo, pode-se inferir que na amostra houve inibidores da reação, os quais podem ter impedido até mesmo a detecção do PMMoV. Outra possibilidade é que a amostra esteja pouco concentrada em relação às fezes, o que consequentemente diminuiria a concentração do PMMoV, dado que este está associado à contaminação da água por fezes. É também plausível considerar que os exemplares negativos possam ter apresentado RNA degradado, especialmente se tratando de amostras mais antigas que foram descongeladas e congeladas, sujeitas a estresse que poderia ter deteriorado o RNA e, por conseguinte, dificultando sua detecção na PCR. Definitivamente, as amostras que resultaram negativas para o PMMoV indicam que estavam inválidas, sem condições ideais para a análise do RNA viral. Dessa forma, torna-se difícil inferir se são verdadeiramente negativas ou positivas para o vírus Influenza.

Embora a análise não tenha detectado os InFV e de NDV nas amostras de esgoto, é importante ressaltar a relevância da análise de águas residuais. Estudos recentes têm mostrado que a vigilância das águas residuais possui o potencial de identificar precocemente a atividade da gripe em uma população (Mercier, E. *et. al.*, 2022). Ao realizar essa detecção, seria possível tomar decisões, monitorar e rastrear o vírus antecipadamente, com o intuito de, se possível, evitar a ocorrência de novos casos de forma exponencial.

Vale destacar também que as amostras negativas para IA e DNC condizem com a não detecção dos respectivos vírus circulantes na cidade. Não foi registrada nenhuma ave doente na cidade de São José do Rio Preto durante o período analisado, o que indica que a região parece estar livre das duas doenças, pelo menos no período considerado. Dessa forma, como os casos foram periciados e testados precocemente, os vírus ainda não penetraram no interior do estado e, consequentemente, não foram detectados nas amostras analisadas. Essa análise destaca a importância da vigilância ativa contra os vírus no país, principalmente no litoral, onde as aves migratórias, potenciais reservatórios dos vírus, chegam ao Brasil. A vigilância, quando realizada de maneira específica e eficiente, apresenta resultados positivos como esses,

capazes de interromper a transmissão do vírus e obter um controle e rastreamento de quais locais necessitam de maior atenção para a prevenção.

7. CONCLUSÃO

Em síntese, os dados gerados demonstram que 100% das amostras de esgoto analisadas para NDV e IA resultaram negativas entre o ano de 2022 e 2023 na cidade de São José do Rio Preto. O controle rigoroso na entrada do país com relação às aves importadas foi suficiente para prevenir a rápida disseminação do vírus por aves migratórias potencialmente infectadas e livres. Isso permitiu sua detecção e localização ágil para a mitigação de possíveis novos focos da doença. A sazonalidade não foi observada, já que todas as amostras resultaram negativas. Diante disso, ressalta-se a importância e o potencial das WWS (análise de águas residuais), uma vez que esse tipo de análise pode ser aplicado a outros vírus também capazes de instaurar epidemias e pandemias. A experiência prática e os estudos piloto como este contribuirão cada vez mais para o aprimoramento das técnicas empregadas e fornecerão diretrizes para outros trabalhos de vigilância, os quais são de suma importância para as populações.

REFERÊNCIAS

- ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frango (2008). “Relatório anual 2008/2009.” Disponível em: http://www.abef.com.br/portal/_clientes/abef/cat/Abef%20RA_4021.pdf. Acesso em: 25 out. 2023.
- ALEXANDER, D. J. Newcastle disease and other paramyxovirus infections. In: CALNEK, B. W. et al. Diseases of poultry. 10.ed. Ames: Iowa State University Press, p.64-87, 2003.
- ALEXANDER, D.J. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. J. Comp. Pathol., v.112, p.105-126, 1995.
- BELLEI, N. Melchior, T.B. H1N1: pandemia e perspectiva atual. J Bras Patol Med Lab, 2011. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000600007>.
- BIVINS, A. et al. Variabilidade dentro e entre dias do RNA do SARS-CoV-2 em águas residuais municipais durante períodos de prevalência e positividade variáveis de COVID-19. ACS ES&T Water Acsestwater. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.1c00178> (2021).
- BOEHM, Alexandria B.; HUGHES, Bridgette; DUONG, BS, Dorothea; CHAN-HERUR, Vikram; BUCHMAN, Anna; WOLFE, Marlene K. Wastewater concentrations of human influenza, metapneumovirus, parainfluenza, respiratory syncytial virus, rhinovirus, and

seasonal coronavirus nucleic-acids during the COVID-19 pandemic: a surveillance study. ., [s. l.], 22 mar. 2023. DOI [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00386-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00386-X).

BRAAKMAN, I., Anken, E. (2000). “Folding of viral envelope glycoproteins in the endoplasmic reticulum.” *Traffic* 1: 533-539.

BR, GOV. Doença de Newcastle (DNC): Ministério da Agricultura e Pecuária. [S. l.], 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/doenca-de-newcastle#>. Acesso em: 18 out. 2023.

BROWN C., King D.J. & Seal B.S. 1999. Pathogenesis of Newcastle disease in chickens experimentally infected with viruses of different virulence. *Vet. Pathol.* 36(2):125-132. <http://dx.doi.org/10.1354/vp.36-2-125>.

BROWN, E. G. (2000). “Influenza virus genetics.” *Biomed. Pharmacother.*, 54(4): 196- 209.

BUCHEN-OSMOND, C. (2003). “Orthomyxoviridae”. In: *ICTVdB - The Universal Virus Database*, version 3 . ICTVdB Management. Columbia University, New York, USA.

BUKREYEV A., Collins PL Vírus da doença de Newcastle como vetor de vacina para humanos. *Curr. Opinião. Mol. Lá.* 2008; 10 (1):46-55.

CANADIAN Water Network (CWN). Phase I Inter-Laboratory Study: Comparison of approaches to quantify SARS-CoV-2 RNA in wastewater. (2020).

CHAMBERS, P. , NS Millar , RW Bingham , PT Emmerson. Clonagem molecular de DNA complementar ao vírus da doença de Newcastle e análise da sequência de nucleotídeos da junção entre os genes que codificam a hemaglutinina- neuraminidase e a proteína grande. *J. Gen. Virol.* , 67 (1986) , pp. 475 - 486.

CHAN, M. C.,, N. Lee, P.K. Chan, K.F. To, R.Y. Wong, W.S. Ho, K.L. Ngai, J.J. Sung Seasonal influenza A virus in feces of hospitalized adults *Emerg. Infect. Dis.*, 17 (11) (2011), pp. 2038-2042.

CHEN, H. et al. Gripe aviária: surto do vírus H5N1 em aves aquáticas migratórias. *Natureza* 436, 191–192 (2005).

CHERNICHARO, CA de L, Araújo JC, Mota Filho CR, Bressani-Ribeiro T, Chamhum-Silva L, Leal CD, et al. Monitoramento do esgoto como ferramenta de vigilância epidemiológica para controle da COVID-19: estudo de caso na cidade de Belo Horizonte. *Eng Sanit Ambient* [Internet]. 2021Aug;26(4):691–9. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1413-415220200243>.

CONSÓRCIO Global para Vírus H5N8 e Influenza Relacionados. Papel das aves selvagens migratórias na propagação global da gripe aviária H5N8 . *Ciência* . 2016; 354 :213–217. doi: 10.1126/science.aaf8852.

CUEVAS-Ferrando, E., Randazzo Walter, Pérez-Cataluña Alba, Sánchez Gloria, HEV Occurrence in Waste and Drinking Water Treatment Plants. *Frontiers in Microbiology*.10 ,2020. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02937>

doi 10.3389/fmicb.2019.02937.

D'AOUST, PM et al. Análise quantitativa do RNA SARS-CoV-2 de sólidos de águas residuais em comunidades com baixa incidência e prevalência de COVID-19. *Água Res.* 188 , 116560 (2021).

DE Leeuw, O. , B. Peeters Sequência completa de nucleotídeos do vírus da doença de Newcastle: evidências da existência de um novo gênero dentro da subfamília Paramyxoviridae *J. Gen. Virol.* , 80 (1999) , pp. 131 - 136.

DE Leeuw OS, Koch G., Hartog L., Ravenshorst N., Peeters BP A virulência do vírus da doença de Newcastle é determinada pelo local de clivagem da proteína de fusão e pela região do caule e pela cabeça globular da proteína hemaglutinina-neuraminidase. *J. Gen. Virol.* 2005; 86 (Pt 6): 1759–1769.

DENG Y., X. Zheng, X. Xu, H.K. Chui, W.K. Lai, S. Li, H.M. Tun, L.L.M. Poon, J. Ding, M. Peiris, G.M. Leung, T. Zhang. Use of sewage surveillance for COVID-19: a large-scale evidence-based program in Hong Kong *Environ. Health Perspect.*, 130 (5) (2022), p. 57008.

DSA; Departamento de Saúde Animal e Insumos Pecuários. DOENÇA de Newcastle: Ficha Técnica. [S. l.], 1 abr. 2020. Disponível em: https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/imagens/copy_of_FichaTcnica_NEWCASTLE_abril_20.pdf. Acesso em: 3 nov. 2023.

DOMANSKA-Blicharz, K., Minta, Z., Smietanka, K., Marche, S. & van den Berg, T. H5N1 high pathogenicity avian influenza virus survival in different types of water. *Avian Dis.* 54 (1 Suppl), 734–737, 2010.

ECO, O. As aves conectam e inspiram pessoas para a conservação da biodiversidade. [S. l.], 14 out. 2020. Disponível em: [https://oeco.org.br/analises/as-aves-conectam-e-inspiram-pessoas-para-a-conservacao-da-biodiversidade/#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20detentor%20de,de%20extin%C3%A7%C3%A3o%20\(174%20esp%C3%A9cies\)](https://oeco.org.br/analises/as-aves-conectam-e-inspiram-pessoas-para-a-conservacao-da-biodiversidade/#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20detentor%20de,de%20extin%C3%A7%C3%A3o%20(174%20esp%C3%A9cies).). Acesso em: 18 out. 2023.

ESTADO DE SÃO PAULO, Defesa Agropecuária. DOENÇA DE NEWCASTLE. DNC, [s. l.], 2 jun. 2015. Disponível em: https://www.defesa.agricultura.sp.gov.br/educacao-sanitaria/files/cards/link_doencas_newcastle.pdf. Acesso em: 3 out. 2023.

FIOCRUZ (São Paulo). Centro de Estudos Estratégicos da Fiocruz Antonio Ivo de Carvalho. Combate à epidemia de H1N1: um histórico de sucesso. 26 jan. 2021. Disponível em: <https://cee.fiocruz.br/?q=node/1314>. Acesso em: 8 jun. 2023.

FLORES, M.L.; SEGABINAZE, S.D.; SANTOS, H.F.; BASSAN, J.D.L. Epidemiologia da Doença de Newcastle – Revisão bibliográfica. *A Hora Veterinária.* n. 153, p. 57-61, 2006.

GAITONDE DY, Moore FC, Morgan MK. Influenza: Diagnosis and Treatment. *Am Fam Physician.* 2019 Dec 15;100(12):751-758. PMID: 31845781.

GANAR, K., Das M, Sinha S, Kumar S. Newcastle disease virus: current status and our understanding. *Virus Res.* 2014 May 12;184:71-81. doi: 10.1016/j.virusres.2014.02.016. Epub 2014 Mar 1. PMID: 24589707; PMCID: PMC7127793.

GOLONO, M. A.. Epidemiologia e caracterização molecular de vírus da influenza em aves residentes e migratórias / Miguel Augusto Golovo. -- São Paulo, 2009.

GOV.BR (Brasil). Ministério da Agricultura e Pecuária. Influenza aviária. Google, 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saudeanimal/programas-de-saude-animal/pnsa/influenza-aviaria>. Acesso em: 8 jun. 2023.

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO (São Paulo). Portal de Educação Ambiental. 8 DE MAIO – DIA MUNDIAL DAS AVES MIGRATÓRIAS. Google, 8 maio 2023. Disponível em: <https://www.infraestruturameioambiente.sp.gov.br/educacaoambiental/2023/05/8-de-maio-diamundial-das-aves-migratorias/#>. Acesso em: 8 jun. 2023.

HEIJEN L, Medema G. Surveillance of influenza A and the pandemic influenza A (H1N1) 2009 in sewage and surface water in the Netherlands. *J Water Health.* 2011 Sep;9(3):434-42. doi: 10.2166/wh.2011.019. PMID: 21976191.

HILLEMANN, M. R. (2002). “Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control.” *Vaccine*, 20: 3068-3087.

HINSHAW, V. S., and R. G. Webster. 1982. The natural history of influenza A viruses, p. 79-104. In A. S. Beare (ed.), *Basic and applied influenza research*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

HUANG Z., Elankumaran S., Panda A., Samal SK Vírus recombinante da doença de Newcastle como vetor de vacina. *Poult. Ciência.* 2003; 82 (6):899–906.

HUMAYUN A., Ousmane M. Diop, Goitom Weldegebriel, Farzana Malik, Sushmitha Shetty, Laila El Bassioni, Adefunke O. Akande, Eman Al Maamoun, Sohail Zaidi, Adekunle J. Adeniji, Cara C. Burns, Jagadish Deshpande, M. Steve Oberste, Sara A. Lowther, Environmental Surveillance for Polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 210, Issue suppl_1, novembro de 2014, páginas S294–S303, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu384>.

HURTADO, R. F.. Vigilância epidemiológica dos vírus da influenza aviária em aves migratórias na região costeira da Amazônia. 2013. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/T.10.2014.tde-24042014-105030. Acesso em: 2023-11-10.

JUNQUEIRA, Bruna Rayane Teodoro. Estabelecimento de um sistema de genética reversa para Pepper mild mottle virus e uso da capa protéica como apresentador de epítomos. Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Departamento de Biologia Celular Pós-Graduação em Biologia Molecular, [S. l.], p. 01-90, 1 jan. 2014.

KALETA E., Baldauf C. Doença de Newcastle em aves de vida livre e de estimação. In: Alexander DJ, editor. Doença de Newcastle. Kluwer Academic Press; Boston, MA: 1988.

KATHRYN D. Huggett, Floyd C. Knoop, Influenza A, Editor(s): S.J. Enna, David B. Bylund, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, Elsevier, 2007, Pages 1-7, ISBN 9780080552323. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60922-5>.

KEVILL, J. L. et al. Assessment of two types of passive sampler for the efficient recovery of SARS-CoV-2 and 363 other viruses from wastewater. *Sci. Total Environ.* 838, 156580 (2022).

KITAJIMA, M., Sassi, HP & Torrey, JR Pepper Mild Mottle Virus como indicador de qualidade da água. *npj Água Limpa* 1, 19 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41545-018-0019-5>.

KLUMPP, K., Ruigrok, R. W., Baudin, F. (1997). "Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure." *EMBO J.*, 16(6): 1248-1257.

KRAMMER, F., Smith, GJD, Fouchier, RAM et al. Gripe. *Nat Rev Dis Primers* 4, 3 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>.

KRISHNAMURTHY S., Huang Z., Samal SK Recuperação de uma cepa virulenta do vírus da doença de Newcastle a partir de cDNA clonado: a expressão de um gene estranho resulta em retardo e atenuação do crescimento. 1998. *Virologia*. 2000; 278 (1):168–182.

KRISHNAMURTHY, S.;SK Samal. Sequências de nucleotídeos do trailer, gene da proteína do nucleocapsídeo e regiões intergênicas da cepa Beaudette C do vírus da doença de Newcastle e conclusão de toda a sequência do genoma. *J. Gen. Virol.*, 79 (1998), pp. 2419 - 2424.

LAMB R., Parks G. Paramyxoviridae : os vírus e sua replicação. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B., Straus SE, editores. *Virologia de Campos*. 5ª edição. Lippincott Williams & Wilkins; Filadélfia: 2007. pp.

LA TURNER, Z. W., D.M. Zong, P. Kalvapalle, K.R. Gamas, A. Terwilliger, T. Crosby, P. Ali, V. Avadhanula, H.H. Santos, K. Weesner, L. Hopkins, P.A. Piedra, A.W. Maresso, L.B. Stadler

Evaluating recovery, cost, and throughput of different concentration methods for SARS-CoV-2 wastewater-based epidemiology. *Water Res.*, 197 (2021), Article 117043.

LÉNÈS, D., Nathalie Deboosere, Florence Ménard-Szczebara, Jérôme Jossent, Virginie Alexandre, Claire Machinal, Michèle Vialette, Assessment of the removal and inactivation of influenza viruses H5N1 and H1N1 by drinking water treatment, *Water Research*, Volume 44, Issue 8, 2010, Pages 2473-2486, ISSN 0043-1354, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.01.013>.

LUPIANI B., Sanjay M. Reddy, The history of avian influenza, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, Volume 32, Issue 4, 2009, Pages 311-323, ISSN 0147-9571, <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.01.004>.

LVOV, D.K.; ZDANOV, V.M.; SAZONOV, A.A. et al. Comparison of influenza viruses isolated from man and from whales. *Bull. World Health Organizat.*, v.56, p.923-930, 1978.

MAPA, Ministério da Agricultura e Pecuária. Influenza Aviária: Investigações de Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves realizadas pelo Serviço Veterinário Oficial. (2022-2023). [S. l.], 27 out. 2023. Disponível em: <https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/extensions/SRN/SRN.html>. Acesso em: 27 out. 2023.

MARTINS, RM, Carvalho T, Bittar C, Quevedo DM, Miceli RN, Nogueira ML, Ferreira HL, Costa PI, Araújo JP Jr., Spilki FR, et al. Vigilância de Longo Prazo de Águas Residuais para SARS-CoV-2: Estudo de Um Ano no Brasil. *Vírus* . 2022; 14(11):2333. <https://doi.org/10.3390/v14112333>.

MEDINA, R., García-Sastre, A. Vírus Influenza A: novos desenvolvimentos de pesquisa. *Nat Rev Microbiol* 9 , 590–603 (2011). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2613>.

MERCIER, E., D'Aoust, PM, Thakali, O. et al. Vigilância de águas residuais em nível municipal e de bairro e subtipagem de um surto de vírus influenza. *Sci Rep* 12 , 15777 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-20076-z>.

MERCIER E, Pisharody L, Guy F, Wan S, Hegazy N, D'Aoust PM, Kabir MP, Nguyen TB, Eid W, Harvey B, Rodenburg E, Rutherford C, Mackenzie AE, Willmore J, Hui C, Paes B, Delatolla R e Thampi N (2023) A vigilância baseada em águas residuais identifica o início da temporada do vírus sincicial respiratório pediátrico em duas cidades em Ontário, Canadá. *Frente. Saúde Pública* . 11:1261165. doi: 10.3389/fpubh.2023.1261165.

MORVAN M, A.L. Jacomo, C. Souque, M.J. Wade, T. Hoffmann, K. Pouwels, C. Lilley, A.C. Singer, J. Porter, N.P. Evens, D.I. Walker, J.T. Bunce, A. Engeli, J. Grimsley, K.M. O'Reilly, L. Danon. An analysis of 45 large-scale wastewater sites in England to estimate SARS-CoV-2 community prevalence *Nat. Commun.*, 13 (1) (2022), p. 4313.

NAGARKAR, M. et al. O monitoramento do SARS-CoV-2 em três bacias de esgoto de diferentes escalas e complexidades demonstra relações distintas entre as medições de águas residuais e os dados de casos de COVID-19. *Ciência. Meio Ambiente Total*. 816 , 151534 (2022).

OLIVEIRA JUNIOR, J. G. et al. Vírus da doença de Newcastle em aves não vacinadas no Estado do Rio de Janeiro. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 33, n. 2, p. 381- 383, 2003.

ORGANIZAÇÃO Mundial da Saúde, W. 2022 Dez ameaças à saúde global em 2019.

PANTUA HD, McGinnes LW, Peeples ME, Morrison TG Requisitos para a montagem e liberação de partículas semelhantes ao vírus da doença de Newcastle. *J. Virol.* 2006; 80 (22):11062–11073.

PAULILLO, A. C.; DORETTO JUNIOR, L. Doença de Newcastle. In: BERCHIERI JÚNIOR, A. & MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2000, p.267-81. Jaboticabal: 2000.

PEETERS BP, de Leeuw OS, Verstegen I., Koch G., Gielkens AL Geração de uma vacina quimérica recombinante contra o vírus da doença de Newcastle que permite a diferenciação sorológica entre animais vacinados e infectados. *Vacina*. 2001; 19 (13-14):1616–1627.

PHILLIPS, R. J. , ACR Samson , PT Emmerson. Sequência de nucleotídeos do terminal 5' do vírus da doença de Newcastle e montagem da sequência genômica completa: concordância com a “regra dos seis”. *Arco. Virol.* , 143 (1998) , pp. 1993 - 2002.

RANDAZZO, W., Pilar Truchado, Enric Cuevas-Ferrando, Pedro Simón, Ana Allende, Gloria Sánchez, SARS-CoV-2 RNA in wastewater anticipated COVID-19 occurrence in a low prevalence area, *Water Research*, Volume 181,2020,115942,ISSN 0043-1354,<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115942>.(<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135420304796>).

REVISTA de Saúde Pública. Influenza aviária e casos em humanos (2006). *Revista De Saúde Pública*, 40(1), 187–190. <https://doi.org/10.1590/S0034-891020060001000287>.

SANTISO-Bellón, C.; Randazzo, W.; Pérez-Catalunha, A.; Vila-Vicente, S.; Gozalbo-Rovira, R.; Muñoz, C.; Buesa, J.; Sánchez, G.; Rodríguez Díaz, J. Vigilância Epidemiológica de Norovírus e Rotavírus em Esgotos (2016–2017) em Valência (Espanha). *Microrganismos* 2020 , 8 , 458. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030458>.

SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. PLANO DE CONTINGÊNCIA PARA INFLUENZA AVIÁRIA E DOENÇA DE NEWCASTLE. Versão 1.3, [s. l.], 1 jul. 2009. Disponível em: https://www.agrodefesa.go.gov.br/images/imagens_migradas/upload/arquivos/2014-10/influenza-aviaria-e-doenca-de-newcastle-mapa.pdf. Acesso em: 14 set. 2023.

SEMAE (São José do Rio Preto). Tratamento de Esgoto - ETE. São José do Rio Preto - SP, 2021. Disponível em: <https://semae.riopreto.sp.gov.br/tratamento-de-esgoto.aspx>.

SPACKMAN, Erica Spackman,; SENNE, Dennis A.; MYERS, T. J.; BULAGA, Leslie L.; GARBER, Lindsey P.; PERDUE, Michael L.; LOHMAN, Kenton Lohman; DAUM, Luke T.; SUAREZ, David L. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. ., [s. l.], v. 40, ed. 9, 18 jun. 2002.

VIJAYKRISHNA, D. et al. Evolutionary dynamics and emergence of panzootic H5N1 influenza viruses. *PLoS Pathog.* 4, e1000161 (2008).

WEBSTER, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T., M., Kawaoka, Y. (1992). “Evolution and ecology of influenza A viruses.” *Microbiol. Rev.*, 56(1): 152-179.

WEBSTER, R. G., Yakhno, M., Hinshaw, V. S., Bean, W. J. & Murti, K. G. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. 1978 *Virology* 84, 268–278.

WHO, 2022. World Health Organization. One Health Joint Plan of Action launched to address health threats to humans, animals, plants and environment. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/17-10-2022-one-health-joint-plan-of-action-launched-to-address-health-threats-to-humans--animals--plants-and-environment>. Acesso em: 12/07/23.

WHO, 2005. World Health Organization. One Health Joint Plan of Action launched to address health threats to humans, animals, plants and environment. Disponível em:

[https://www.who.int/news/item/17-10-2022-one-health-joint-plan-of-action-launched-toaddress-health-threats-to-humans--animals--plants-and-environment](https://www.who.int/news/item/17-10-2022-one-health-joint-plan-of-action-launched-to-address-health-threats-to-humans--animals--plants-and-environment). Acesso em: 12/07/23.

WISE, Mark G. *et al.* Desenvolvimento de PCR de transcrição reversa em tempo real para detecção de RNA do vírus da doença de Newcastle em amostras clínicas. *ASM Journals*, [S. l.], p. 1-42, 1 jan. 2004. DOI <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.329-338.2004>. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jcm.42.1.329-338.2004>. Acesso em: 12 dez. 2023.

WILDE, A.; C. McQuain, T. Morrison. Identificação do conteúdo da sequência de quatro transcritos policistronicos sintetizados em células infectadas pelo vírus da doença de Newcastle. *Res. de vírus.*, 5 (1986), pp. 77 - 95.

WOLFE, M. K., D. Duong, K.M. Bakker, M. Ammerman, L. Mortenson, B. Hughes, P. Arts, A.S. Luring, W.J. Fitzsimmons, E. Bendall, C.E. Hwang, E.T. Martin, B.J. White, A.B. Boehm, K.R. Wigginton. Wastewater-based detection of two influenza outbreaks *Environ. Sci. Technol. Lett.* (2022).

WOLFE, MK et al. Dimensionamento do RNA do SARS-CoV-2 em sólidos sedimentados de diversas estações de tratamento de águas residuais para comparar as taxas de incidência de COVID-19 confirmada em laboratório em suas bacias de esgoto. *Meio Ambiente. Ciência. Tecnologia. Vamos.* <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.1c00184> (2021).

World Health Organization (WHO) (1999). Influenza Fact Sheet 211.

WOLKEN M., T. Sun, C. McCall, R. Schneider, K. Caton, C. Hundley, L. Hopkins, K. Ensor, K. Domakonda, P. Kalvapalle, D. Persse, S. Williams, L.B. Stadler
Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 and influenza in preK-12 schools shows school, community, and citywide infections. *Water Res.*, 231 (2023), Article 119648.

YEWDELL, J., Garcia-Sastre, A. (2002). "Influenza virus still surprises." *Cur. Opin.Microbiol.*, 5: 414-418.

ZHAN, Q. et al. Relações entre SARS-CoV-2 em águas residuais e casos clínicos e hospitalizações de COVID-19, com e sem normalização em relação a indicadores de dejetos humanos. *ACS ES&T Água* <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00045> (2022).

ZHENG X, Keyue Zhao, Xiaoqing Xu, Yu Deng, Kathy Leung, Joseph T. Wu, Gabriel M. Leung, Malik Peiris, Leo L.M. Poon, Tong Zhang, Development and application of influenza virus wastewater surveillance in Hong Kong, *Water Research*, Volume 245, 2023, 120594, <https://doi.org/10.1016/j.watres.2023.120594>.

ZHENG X, S. Li, Y. Deng, X. Xu, J. Ding, F.T.K. Lau, C. In Yau, L.L.M. Poon, H.M. Tun, T. Zhang. Quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater treatment plants mirrors the pandemic trend in Hong Kong. *Sci. Total Environ.*, 844, 2022, Article 157121.