



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS – PPGVET

TAYANE BRUNA SOARES MAGALHÃES

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DOS VÍRUS DA INFLUENZA  
AVIÁRIA E AVULAVÍRUS AVIÁRIO SOROTIPO 1 EM AVES SILVESTRES NO  
ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL

Cuiabá  
2024

TAYANE BRUNA SOARES MAGALHÃES

INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DOS VÍRUS DA  
INFLUENZA AVIÁRIA E AVULAVÍRUS AVIÁRIO SOROTIPO 1 EM AVES  
SILVESTRES NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Mato Grosso, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias, área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle de Doenças de Animais Domésticos e Silvestres

Orientador: Prof. Dr. Daniel Moura de Aguiar

Cuiabá

2024

### Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

M188i Magalhães, Tayane Bruna Soares.

Investigação molecular e epidemiológica dos vírus da Influenza aviária e Avulavírus aviário sorotipo 1 em aves silvestres no estado de Mato Grosso, Brasil [recurso eletrônico] : Dissertação de Mestrado / Tayane Bruna Soares Magalhães. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 108 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientador: Daniel Moura de Aguiar.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Faculdade de Agronomia, Medicina Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Cuiabá, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. Charadrius collaris. 2. Pantanal. 3. RT-qPCR. 4. Vigilância epidemiológica. I. Aguiar, Daniel Moura de, *orientador*. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: INVESTIGAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLÓGICA DOS VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA E AVULAVÍRUS AVIÁRIO SOROTIPO 1 EM AVES SILVESTRES NO ESTADO DE MATO GROSSO, BRASIL**

AUTOR (A): Mestranda Tayane Bruna Soares Magalhães

Dissertação defendida e aprovada em 28 de fevereiro de 2024.

**COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA**

Doutor Daniel Moura de Aguiar (Presidente Banca/Orientador)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutor Jansen de Araujo (Examinador Externo)

Doutor João Batista de Pinho (Examinador Interno)

Instituição: Instituto de Ciências Biomédicas -ICB/USP

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Doutora Valéria Dutra (Examinadora Suplente)

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

Cuiabá, 28 de fevereiro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **DANIEL MOURA DE AGUIAR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 05/03/2024, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jansen de Araújo, Usuário Externo**, em 05/03/2024, às 15:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **JOAO BATISTA DE PINHO, Técnico Administrativo em Educação do PPG EC da Biodiversidade / IB - UFMT**, em 05/03/2024, às 19:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.ufmt.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **6663537** e o código CRC **C5F5DB94**.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, sempre incentivadora nas minhas buscas por conhecimentos e aprendizados.

Ao meu orientador Dr. Daniel Moura de Aguiar que me concedeu a oportunidade de trabalhar com esta pesquisa e tem me acompanhado com muita paciência.

Ao Dr. Jansen de Araújo que tem compartilhando conosco os seus conhecimentos.

À minha amiga Nathalia Assis que me ensinou e me acompanhou durante meus primeiros passos no universo da biologia molecular e está sempre disposta a me auxiliar no resolvimento de intercorrências.

A toda equipe de pesquisadores e ornitólogos envolvidos neste trabalho, em especial a Elaine Bueno que me direcionou ao entendimento da ecologia das aves.

Agradecimento especial ao nosso estado de Mato Grosso pela sua rica avifauna e a todas as majestosas espécies capturadas para a realização da pesquisa.

Por fim, agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), a Universidade Federal de Mato Grosso e à Faculdade de Medicina Veterinária, minha segunda casa há dez anos, que me proporciona a realização de estudos tão gratificantes.

## RESUMO

As aves silvestres aquáticas das ordens Anseriformes e Charadriiformes são hospedeiras naturais do vírus da influenza aviária (AIV) e do vírus da doença de Newcastle. As espécies migratórias desempenham um papel significativo na disseminação intra e intercontinental desses patógenos, além de contribuírem para amplificação e manutenção viral em ambientes silvestres. A ocorrência de transbordamento viral interespecies não é incomum, portanto, o monitoramento epidemiológico que visa detectar a circulação desses vírus na avifauna é imprescindível, principalmente em locais que funcionam como sítios de escala e invernada de aves migrantes. O estado de Mato Grosso (MT), situado no Brasil Central, é percorrido por duas importantes rotas migratórias intercontinentais, onde alguns sítios de concentração aviária estão localizados em regiões periurbanas, sendo comumente observado o contato próximo entre a fauna silvestre, doméstica e seres humanos. Esse estado é composto por três biomas ricos em biodiversidade: Amazônia, Cerrado e Pantanal, nos quais já foram catalogadas 916 espécies diferentes de aves silvestres. Tendo em vista as características ecológicas do estado de MT, o objetivo desta pesquisa foi investigar indícios de atividade viral de AIV e NDV na avifauna local. Ao todo, foram testadas para ambos agentes, pela técnica de RT-qPCR 1.138 amostras de swabs orotraqueais e cloacais. Resultado positivo para *Alphainfluenzavirus* foi detectado em amostra coletada de uma ave silvestre pertencente à espécie *Charadrius collaris*, capturada na Baía de Chacororé, localizada no município de Barão de Melgaço (MT). A amostra positiva foi submetida ao sequenciamento genômico (NGS), mas não foi possível obter o genoma completo para confirmação do subtipo viral. Todas as demais amostras testaram negativas para ambos agentes. O monitoramento epidemiológico na região e novas buscas deverão ser realizadas para investigação desses vírus na região do Pantanal mato-grossense.

**Palavras-chave:** *Charadrius collaris*. Pantanal. RT-qPCR. Vigilância epidemiológica.

## ABSTRACT

Wild waterfowl of the orders Anseriformes and Charadriiformes are natural hosts of avian influenza virus (AIV) and Newcastle disease virus (NDV). Migratory species play a significant role in the intra and intercontinental dissemination of these pathogens, contributing to viral amplification and maintenance in wild environments. Interspecies viral spillover is not uncommon; there, epidemiological monitoring aimed at detecting the circulation of these viruses in birdlife is essential particularly in sites serving as stopover and wintering areas for migratory birds. The state of Mato Grosso (MT), located in the Central-West region of Brazil, is traversed by two important intercontinental migratory routes, with some bird concentration sites situated in peri-urban areas, where close contact between wild fauna, domestic animals, and humans is commonly observed. This state comprises three biomes rich in biodiversity: Amazon, Cerrado and Wetland, where 916 different species of wild birds have already been cataloged. Given the ecological characteristics of the state of MT, the objective of this research was to investigate whether there is evidence of AIV and NDV circulation in the local avifauna. In total, 1.138 samples oropharyngeal and cloacal swabs were tested for both agents using the RT-qPCR technique. Positive result for *Alphainfluenzavirus* was detected in sample collected from a wild bird belonging to the species *Charadrius collaris*, captured in Chacororé Bay, located in the municipality of Barão de Melgaço (MT). The positive sample was subjected to genomic sequencing (NGS), but it was not possible to obtain the complete genome for confirmation of the viral subtype. All other samples tested negative for both agents. Epidemiological monitoring in the region and further searches will be conducted to investigate these viruses in the Pantanal region of Mato Grosso.

**Keywords:** *Charadrius collaris*. Wetland. RT-qPCR. Epidemiological monitoring.

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	11
2.1	Influenza aviária.....	11
2.1.1	Etiologia .....	11
2.1.2	Hospedeiros .....	15
2.1.3	Patogenia e Patogenicidade.....	15
2.1.4	Mecanismos de evolução dos AIVs.....	18
2.1.5	Transmissão.....	21
2.1.6	Sinais clínicos.....	22
2.1.7	Diagnóstico.....	23
2.1.8	Situação atual da influenza aviária no Brasil e no mundo.....	27
2.1.9	Influenza aviária no Brasil.....	29
2.2	Movimentos migratórios na disseminação de influenza aviária .....	31
2.3	<i>Charadrius collaris</i> .....	35
2.4	Doença de Newcastle .....	38
2.4.1	Etiologia .....	38
2.4.2	Hospedeiros .....	43
2.4.3	Patogenia e Patogenicidade.....	43
2.4.4	Sinais clínicos.....	46
2.4.5	Transmissão.....	47
2.4.6	Diagnóstico.....	48
2.4.7	Cenário atual da doença de Newcastle no Brasil.....	49
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
3.1	Material biológico .....	50
3.2	Análise molecular.....	53
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	55
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	64
<b>8</b>	<b>APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA</b> .....	76
<b>9</b>	<b>APÊNDICE B – CLASSIFICAÇÃO DA REVISTA</b> .....	98
<b>10</b>	<b>APÊNDICE C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO</b> .....	99

## 1 INTRODUÇÃO

A influenza aviária e a doença de Newcastle (DNC) são as principais doenças virais altamente transmissíveis responsáveis pela Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves (SRN), ambas possuem distribuição mundial e são consideradas enfermidades zoonóticas de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial e a Organização Mundial da Saúde Animal (WOAH) (NURZIJAH *et al.*, 2022; FLORES, 2017). O Vírus Influenza A e o Avulavírus aviário sorotipo 1, comumente denominado vírus da doença de Newcastle, são responsáveis por grandes prejuízos socioeconômicos e ambientais, tais como queda na produtividade animal, altas taxas de morbidade e mortalidade na avicultura industrial, limitação do comércio internacional de aves e seus subprodutos, além de investimentos em medidas de prevenção e controle de surtos. Em relação a avifauna silvestre, cepas patogênicas podem ameaçar a biodiversidade, causando alterações ecológicas significativas (MEHRABADI *et al.*, 2022; RAMEY *et al.*, 2022). Custos direcionados para cuidados com a saúde coletiva também são importantes, pois trata-se de patógenos com potencial zoonótico. Adicionalmente, a circulação de subtipos do vírus influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI) traz consigo sérias ameaças a segurança da saúde pública mundial, em virtude da capacidade dessas variantes em romper barreiras interespecies (WU *et al.*, 2023).

As aves silvestres aquáticas e limícolas das ordens Anseriformes e Charadriiformes são os reservatórios naturais dos Vírus Influenza A e do Avulavírus Aviário tipo 1 (AAVv-1) (FLORES, 2017). Dentro dessas duas ordens, as espécies que realizam movimentos migratórios são consideradas as principais disseminadoras globais desses agentes, pois alguns grupos se deslocam por longas distâncias em rotas intercontinentais realizando diversos pousos até alcançar seu destino. As paradas durante o percurso migratório possibilitam o contato entre espécies migrantes distintas e a avifauna residente de diversas localizações geográficas, favorecendo a troca de diferentes cepas virais (BODEWES E KUIKEN, 2018; ARAÚJO *et al.*, 2017). As aves residentes também participam da dispersão viral pois algumas populações se deslocam de 50 a 100 km dentro do território nacional (LEITE *et al.*, 2020).

Há cinco rotas migratórias utilizadas pelas aves silvestres neárticas ou setentrionais dentro do Brasil, onde duas delas passam pela região central do

país (Rota do Brasil Central e Rota Amazônia Central Pantanal) permitindo assim a introdução de aves infectadas para o estado de Mato Grosso (MT). Esses migrantes procuram locais de invernada com grande disponibilidade de recursos alimentares para suprir os altos gastos energéticos direcionados a atividades fisiológicas como a muda e reprodução, principalmente na região do Pantanal mato-grossense considerado um grande hotspot de biodiversidade (JAHN *et al.*, 2020; ICMBIO, 2019).

O Brasil lidera o ranking de maior exportador e ocupa o segundo lugar como maior produtor de carne de frangos do mundo, sendo a produção avícola umas das mais importantes atividades agropecuárias para a economia do país (EMBRAPA, 2023; ONO, LIMA, RIBEIRO, 2021). Não são registrados surtos de NDV em aves comerciais e de subsistência em território brasileiro desde o ano de 2006, atualmente a doença é considerada exótica no Brasil (FLORES, 2017).

Surtos globais de influenza aviária altamente patogênica HPAI (H5N1), vem sendo notificados em diferentes países com taxas de infecções alarmantes, acometendo populações de aves silvestres e de capoeira, além de mamíferos silvestres, em dimensões sem precedentes (AHMAD *et al.*, 2023). Essa endemia de HPAI que acomete o cenário mundial atual iniciou no ano de 2020 na Europa e configura a maior já registrada na América do Norte, Japão e América do Sul (AHMAD *et al.*, 2023). Em maio de 2023, houve a primeira detecção do vírus H5N1 (clado 2.3.4.4b) em aves silvestres em solo brasileiro, no estado do Espírito Santo. Desde então, foram registrados 151 focos em aves silvestres e 03 em aves de subsistência, predominantemente em municípios litorâneos (MAPA, 2023; REISCHAK *et al.*, 2023). O país mantém o status de livre de Influenza aviária altamente patogênica na avicultura industrial, e medidas de prevenção da disseminação da HPAI e controle de surtos foram instituídas. Todo o território nacional se encontra em estado de emergência zoossanitária, decretado desde maio pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA, 2023).

As zoonoses virais compreendem mais de 70% das doenças com tendências emergentes e reemergentes. Nas últimas décadas, verificou-se que os processos de antropização contribuem diretamente com o surgimento de epidemias, como consequência das intensas modificações nos ecossistemas naturais que propiciam maiores interações entre a fauna silvestre, doméstica e o homem (MARIE; GORDON, 2023).

O estudo desses agentes virais precisa ser realizado sobre perspectiva de Saúdes Única (One Health), pois a ocorrência de surtos e epidemias em aves comerciais, silvestres ou de subsistência infligem negativamente a economia, a saúde pública e ecológica dos locais afetados. A prevenção e controle de doenças causadas por patógenos com potencial zoonótico só tende a ser eficiente quando abordados programas multidisciplinares que prezem pelo bem-estar da saúde humana, animal (domésticos e silvestres) e do meio ambiente (GHAJ *et al.*, 2022).

O estado de Mato Grosso compreende uma região com intensa atividade agrícola e agropecuária, com vastas áreas de antropização e centros periurbanos que facilitam o contato estreito entre a população humana, animais domésticos e a fauna silvestre extremamente rica nessa área do país. Dentro desse contexto e frente ao presente cenário mundial panzoótico (2020 - 2023) com os crescentes surtos globais de HPAI (H5N1), compreende-se que o estado de Mato Grosso seja um local propício a introdução de patógenos virais originários e carreados pela avifauna silvestre provenientes de diversas localidades geográficas, tendo em vista que duas importantes rotas migratórias intercontinentais atravessam a região Centro-Oeste do Brasil.

Portando, objetivamos realizar investigações epidemiológicas de vigilância ativa com utilização de técnica molecular Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) para monitorar e detectar precocemente a circulação dos AIV e NDV em aves silvestres em cinco municípios do estado de Mato Grosso. Ainda há carência de informações a respeito de quais espécies estão associadas á disseminação a longas distâncias do AIV e NDV com introdução na região Centro-Oeste do Brasil, assim como as espécies residentes que funcionam como reservatórios e perpetuam a propagação viral.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Influenza aviária**

#### **2.1.1 Etiologia**

Os Vírus Influenza A são os principais agentes infecciosos causadores de doenças respiratórias em humanos e animais; frequentemente subtipos de origem aviária estão associados á ocorrência de epidemias (THOMPSON;

PAULSON, 2021). A circulação de HPAI em aves acarreta grandes prejuízos socioeconômicos afetando de forma direta ou indireta toda a cadeia produtiva (produtores, funcionários das indústrias agrícolas e parceiros comerciais), além do mercado consumidor, haja vista, que a carne de frango é uma das principais fontes de proteína animal consumidas mundialmente (MEHRABADI *et al.*, 2022; FLORES, 2017).

Os vírus da influenza aviária comumente conhecida como “gripe aviária” foram os grandes responsáveis por pandemias ao longo da história com altas taxas de mortalidade na população humana e animal. Há registros históricos que sugerem a ocorrência de epidemias causadas por AIV desde o século V a.C. (KIM; WEBSTER; WEBBY, 2018; COSTA; MERCHAN-HAMANN, 2016), contudo as principais pandemias decorrentes de infecções causadas por vírus influenza aviária que possuem registros confiáveis foram: a gripe espanhola em 1918 (H1N1) que causou um número maior de óbitos na população humana em comparação com a Primeira Guerra Mundial; a gripe asiática em 1957 (H2N2) e a gripe de Hong Kong em 1968 (H3N2). No ano de 2009 houve uma nova pandemia causada pelo vírus H1N1 que circulava em suínos, estudos demonstraram que essa cepa viral teve origem a partir do rearranjo genético entre os vírus influenza aviário, humano e suíno (AKIN; GOZEL, 2020; LYCETT; DUCHATEL; DIGART, 2019).

Os hospedeiros naturais dos vírus influenza aviários de baixa patogenicidade (LPAI) são as aves aquáticas silvestres das ordens Anseriformes e Charadriiformes, nessas aves os VIA circulam de forma assintomática, contudo em aves domésticas podem levar a manifestações clínicas brandas de doença (BEERENS *et al.*, 2020). Cepas patogênicas (HPAI) apresentam alto potencial em romper as barreiras interespecies e causar infecções em uma ampla variedade de aves e mamíferos (domésticos e de vida livre), além de humanos. A ocorrência de transbordamento viral na interface selvagem-doméstica não é incomum em casos de epidemias de HPAI pelos subtipos H5 e H7 (HILL *et al.*, 2022; FLORES, 2017).

A gripe aviária é uma doença infectocontagiosa de caráter agudo e alta disseminação, possui distribuição mundial estando listada como doença de notificação obrigatório pela Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) (AFANADOR-VILLAMIZAR *et al.*, 2017). O agente etiológico pertence à família

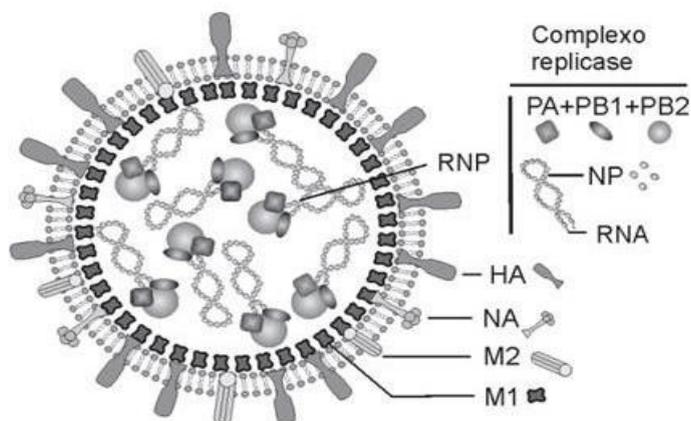
*Orthomyxoviridae*, espécie *Virus influenza A* e gênero *Alphainfluenzavirus*, esses vírus possuem tropismo pelo sistema respiratório e entérico de aves silvestres e domésticas compondo um dos principais agentes causadores da Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves (SRN) (NURZIJAH *et al.*, 2022). Os vírions são esféricos ou filamentosos, medem aproximadamente 100nm e 300nm de comprimento respectivamente; apresentam genoma de ácido ribonucleico (RNA) segmentado, fita simples com sentido negativo, são envelopados e pleomórficos (NURZIJAH *et al.*, 2022; FLORES, 2017). O genoma composto por 08 segmentos lineares de RNA codifica diferentes proteínas possibilitando a ocorrência de recombinações gênicas. Essa característica genômica associada a duas principais glicoproteínas presentes no envelope viral a Hemaglutinina (HA) e a Neuraminidase (NA) são as grandes responsáveis pela variabilidade antigênica e capacidade mutagênica dos AIV, processos conhecidos como *Shift antigênico* e *Drift antigênico*, estes mecanismos permitem que esses vírus persistam nas populações apesar das respostas imunológicas produzidas pelos hospedeiros (TZARUM, 2022; KIM; WEBSTER; WEBBY, 2018).

A maior diversidade de vírus Influenza A circula de forma persistente nas aves aquáticas silvestres onde 16 dos 18 subtipos de HA e 09 dos 11 subtipos de NA já foram isolados em diferentes combinações (HILL *et al.*, 2022). Os *Alphainfluenzavirus* são classificados em subtipos de acordo com as diferenças antigênicas e filogenéticas da hemaglutinina e neuraminidase (HxNy) e subdivididos em linhagens e clados (MALMBERG *et al.*, 2023). Subtipos LPAI H5 e H7 apresentam maior aptidão em adquirir mutações de cepas altamente patogênicas causando quadros clínicos graves e taxas de mortalidade de até 100% em galinhas (MEHRABADI *et al.*, 2022; LYCETT; DUCHATEL; DIGARD, 2019).

A Hemaglutinina é a glicoproteína mais prevalente nas partículas virais (80%) e a Neuraminidase compreende um total de 17% das proteínas de superfície. Os vírions são compostos também pela proteína da matriz 1 (M1) uma membrana lipídica derivada das células hospedeiras, proteína de membrana 2 (M2) que funciona como um canal de íons. A estrutura viral também se compõe de proteína de exportação nuclear (NEP) e o complexo de ribonucleoproteína (RNP), este último é composto pelos 08 segmentos de RNA que se encontram cobertos pela nucleoproteína (NP) e pelo complexo RNA polimerase que é

formado por três proteínas principais: polimerase básica 1 (PB1), polimerase básica 2 (PB2) e polimerase ácida (PA) (NURZIJAH *et al.*, 2022; FLORES, 2017). A estrutura viral e as funções desempenhadas por cada proteína estão demonstradas na Figura 1 e Figura 2 respectivamente.

**Figura 1.** Componentes estruturais da partícula viral dos Vírus Influenza.



Fonte: Flores (2017).

**Figura 2.** Organização do genoma e produtos codificados pelos *Vírus influenza A*.

Segmento	Gene (ORF)	Proteína/Função
1	Polimerase básica 2	PB2- Componente do complexo replicase. Reconhece e cliva oligonucleotídeos de mRNA celulares.
2	Polimerase básica 1	PB1- Componente do complexo replicase. Possui atividade de polimerase. É a replicase viral.
3	Polimerase ácida	PA- Componente do complexo replicase. Função desconhecida.
4	Hemaglutinina	HA- principal glicoproteína do envelope viral. Medeia a ligação aos receptores e fusão/penetração. Altamente variável.
5	Nucleoproteína	NP- Conjugada com o genoma, forma o nucleocapsídeo. Muito abundante.
6	Neuraminidase	NA- glicoproteína do envelope. Cliva a ligação com o ácido siálico.
7	Proteína da matriz (M1) Proteína integral do envelope (M2)	M1- proteína mais abundante dos vírions. Medeia a interação entre o envelope e os nucleocapsídeo. Participa da morfogênese. M2- proteína integral do envelope. Canal de íons. Essencial para o desnudamento.
8	Proteína não-estrutural (NS1) Proteína não-estrutural (NS2)	NS1- Inibe o <i>splicing</i> de mRNA celulares. NS2- Interage com a M1. Envolvida com a exportação de RNPs do núcleo.

Fonte: Adaptado de Flores (2017).

### 2.1.2 Hospedeiros

As aves silvestres das ordens Anseriformes (patos, cisnes e gansos) e Charadriiformes (gaivotas, andorinhas e aves limícolas) são as hospedeiras naturais e reservatórios dos AIV de baixa patogenicidade, nessas aves os vírus apresentam estabilidade genética realizando taxas mínimas de mutações e evoluções ao longo dos anos, que se justifica pelas baixas pressões de seleção e perfeita adaptação com seus hospedeiros de origem (BEERENS *et al.*, 2020; FLORES, 2017). Nessas aves silvestres os AIVs podem promover manifestações clínicas brandas, mas geralmente cursam com infecções assintomáticas, contudo, há custos ecológicos e fisiológicos sutis decorrentes da infecção em algumas espécies (LYCETT, DUCHATEL, DOGARD, 2019; BODEWES; KUIKEN, 2018).

Os vírus LPAI podem ser transmitidos as aves domésticas de forma direta ou indireta, através de solo e água contaminados com fezes, além de fômites. (BODEWES E KUIKEN, 2018; FLORES, 2017). Os subtipos virais H5 e H7 após infectar principalmente galinhas e perus podem evoluir para HPAI levando a altas taxas de morbidade e mortalidade em aves. O processo de “spillback” (transmissão dos HPAI para aves silvestres) geralmente promove infecções assintomáticas para as espécies selvagens que perpetuam a disseminação dessas cepas virais; em outros casos pode levar a manifestações clínicas graves e elevadas taxas mortalidade como tem ocorrido com o subtipo viral H5N1, clado 2.3.4.4.b (AHMAD *et al.*, 2023; VERHAGEN *et al.*, 2021).

### 2.1.3 Patogenia e Patogenicidade

Infecções pelos AIVs podem ocorrer através da inalação de partículas virais provenientes de gotículas respiratórias ou pela ingestão de materiais contaminados; o período de incubação geralmente varia de um a sete dias. Ao infectar uma célula hospedeira a hemaglutinina presente no envelope viral se liga a moléculas de ácido siálico encontrados na superfície celular. O tipo de ligação entre os vírions e os receptores de ácido siálico (AS) determinam a especificidade por hospedeiros e o tropismo tecidual. Existem dois tipos importantes tipos de receptores que mantêm essa ligação: AS  $\alpha$ -2,3 – galactose (AS  $\alpha$ 2,3 – Gal) encontrados predominantemente no sistema gastrointestinal

(SGI) de aves e AS  $\alpha$ -2,6 galactose (AS  $\alpha$ 2,6 – Gal) predominantes no sistema respiratório superior de humanos (REHMAN *et al.*, 2022; FLORES, 2017).

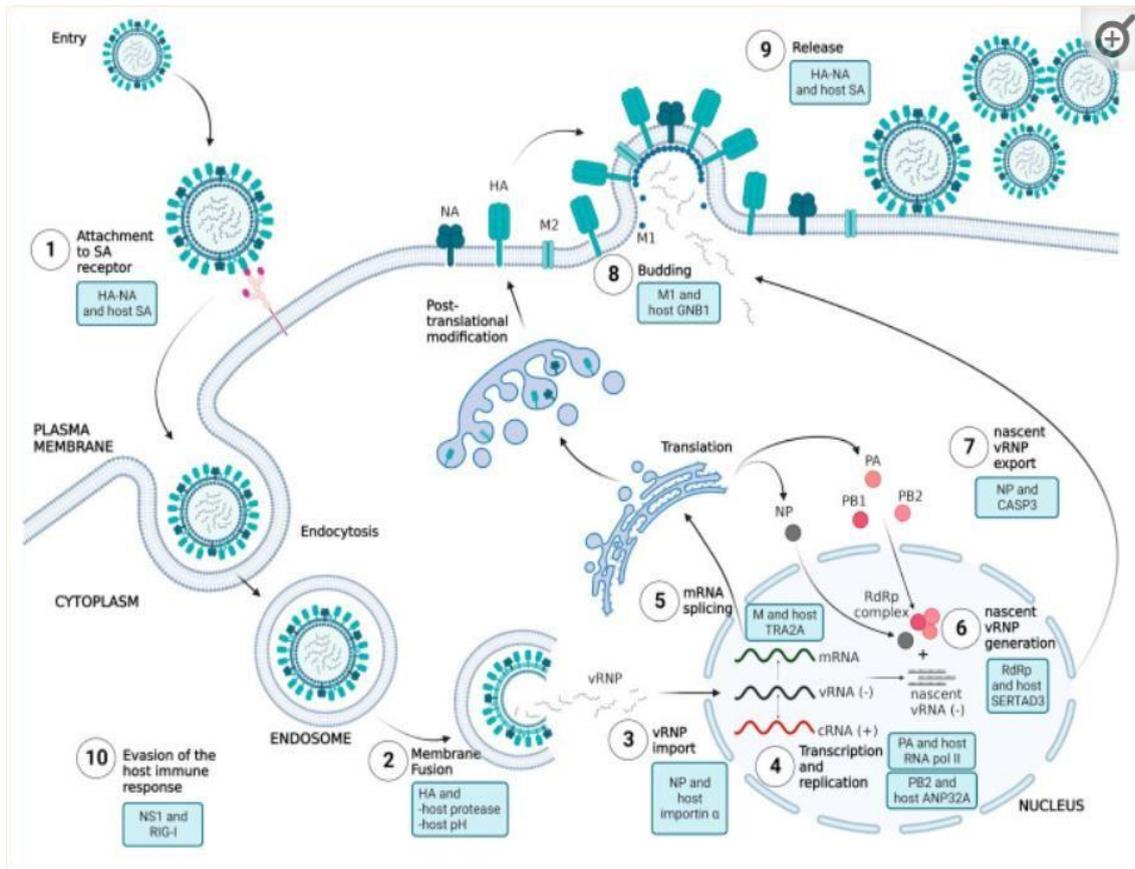
Após estabelecida as ligações HA/AS ocorre a fusão entre a membrana viral e a membrana endossomal hospedeira com consequente internalização do vírus no citoplasma celular através de endocitose mediada por receptor, um endossoma viral é formado e a fusão das membranas virais e endossomais induzem a abertura do canal iônico M2 levando á acidificação e aumento de íons potássio no interior da partícula viral desencadeando a dissociação do Complexo ribonucleoproteico viral (vRNP) da M1 com consequente liberação das vRNP para o citoplasma (REHMAN *et al.*, 2022; BORAU; STERTZ, 2021). As vRNP através da via de importação nuclear mediada por importina  $\alpha$  e  $\beta$  do hospedeiro são transportadas para o núcleo celular. No citoplasma da célula hospedeira ocorre a produção das proteínas PB1 e PB2 e das proteínas não estruturais NS1 e NS2, além das NP, PA e M1, todas essas proteínas recém produzidas são transportadas para o núcleo e participarão do splicing, tradução, transcrição e replicação das novas moléculas virais. No núcleo os processos de replicação e transcrição do RNA viral são efetuados pelas polimerases virais juntamente com a RNA polimerase II do hospedeiro (ABUBAKAR *et al.*, 2023; REHMAN *et al.*, 2022).

Finalizada a transcrição os RNAs mensageiros virais (mRNA<sub>v</sub>) são deslocados do núcleo para o ribossomo celular onde ocorre o processo de tradução. As proteínas virais de superfície, como a HA, NA e M2, são processadas no retículo endoplasmático da célula, glicosiladas no complexo de Golgi e são direcionadas para a membrana em desenvolvimento. A proteína M1 é sintetizada na fase inicial da replicação, a partir do mRNA<sub>v</sub> codificado pelo segmento 07, que, em uma fase mais tardia, sofre o mecanismo de splicing, originando a proteína M2. O mesmo acontece com as proteínas NS1 e NEP/NS2. A formação das novas partículas virais ocorre por brotamento e são liberadas pela ação da neuraminidase que cliva as ligações entre a HA e os receptores de AS, esse mecanismo permite que os novos vírions infectem outras células adjacentes (Figura 3) (REHMAN *et al.*, 2022; DOU *et al.*, 2018).

Os vírus influenza aviários recebem uma segunda classificação de acordo com o índice de patogenicidade em galinhas: Influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI) ou Influenza aviária de baixa patogenicidade (LPAI).

Geralmente os vírus influenza H1-H16 (LPAI) causam doenças respiratórias, entéricas e/ou reprodutivas brandas variando de acordo com a espécie acometida, estado imunológico das aves, infecções secundárias associadas e condições ambientais. Apenas alguns subtipos H5 e H7 estão associados a doenças sistêmicas com alto índice de mortalidade, sendo considerados HPAI (MAPA, 2023; AFANADOR-VILLAMIZAR *et al.*, 2017). Embora apresentem baixa virulência as cepas LPAI desempenham papel importante na diversidade dos AIVs, circulando em maiores proporções nas populações aviárias mundiais e constituindo a principal fonte de surgimento de novas estirpes (BLAGODATSKI *et al.*, 2021).

**Figura 3.** Mecanismo de entrada e replicação do Vírus Influenza A na célula hospedeira.



Fonte: AbuBakar *et al.* (2023).

Conforme o Código Sanitário de Animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH, 2023), considera-se HPAI infecções em aves por qualquer vírus influenza tipo A que possua sequência de aminoácidos do sítio de clivagem HA0 semelhante ao observado para outros isolados de gripe aviária de alta patogenicidade; ou se o índice de patogenicidade intravenosa (IPIV) for superior a 1,2 em um grupo de 10 galinhas com idade entre 4 a 08 semanas de vida. Alternativamente considera-se também HPAI os subtipos que causem mortalidade superior a 75% em 10 dias em galinhas de 04 a 08 semanas infectadas por via intravenosa. São considerados vírus LPAI todos os subtipos de vírus influenza A que apresentem sequência de aminoácidos no sítio de clivagem HA0 diferente do observado em cepas previamente determinadas como de alta patogenicidade ou que apresentem taxa de mortalidade ou IPIV inferior aos HPAI (INDEA, 2023; LEE; CRIADO; SWAYNE; 2021).

#### 2.1.4 Mecanismos de evolução dos AIVs

Existem dois mecanismos genéticos envolvidos nos processos evolutivos dos Vírus Influenza do tipo A: deriva (*drift*) e mudança (*shift*) antigênicas, estas são responsáveis por constantes alterações nos antígenos de superfície hemaglutinina e neuraminidase que ocorrem como respostas á pressões do sistema imunológico dos hospedeiros (DOU *et al.*, 2018).

A deriva antigênica é comumente observada nos vírus influenza sazonais e consiste em mutações pontuais e aleatórias em qualquer região do genoma durante a replicação do material genético, essas alterações são decorrentes da baixa fidelidade do complexo polimerase e falta de capacidade da RNA-polimerase em detectar erros e corrigi-los durante a síntese de novas moléculas de RNA (*proof-reading*), resultando na inserção incorreta de nucleotídeos (NOGUEIRA; PONCE, 2021). Quando essas mutações pontuais ocorrem em aminoácidos das glicoproteínas de superfície HA e NA podem resultar em alterações dos sítios de reconhecimento de anticorpos neutralizantes. Os acúmulos dessas mutações representam uma grande vantagem evolutiva para os vírus influenza, dado que as novas variantes produzidas apresentam potencial de escape da imunidade estimulada por infecções ou vacinações prévias, permitindo a perpetuação do vírus nas populações (DOU *et al.*, 2018; FLORES, 2017).

O genoma segmentado dos vírus influenza tipo A favorece a reorganização genômica através da redistribuição dos segmentos em diferentes combinações, processo conhecido como *shift* antigênico ou reassortment. Esse mecanismo evolutivo é caracterizado pela troca de segmentos genéticos de dois vírus influenza que infectam ao mesmo tempo um hospedeiro conhecido como “vaso de mistura”, essa infecção mista produz variantes com propriedades antigênicas e patogênicas diferentes dos vírus parentais e de seus ancestrais. A ausência de imunidade prévia ao novo vírus formado pode resultar em infecções em aves domésticas, silvestres e mamíferos (inclusive humanos) com altos índices de replicação e transmissão, geralmente essa nova variante apresenta elevado potencial pandêmico (ABDELWHAB; METTENLEITER, 2023; FLORES, 2017). Os recombinantes virais podem ser resultado do rearranjo entre vírus da mesma espécie ou entre espécies diferentes, estima-se que 254 combinações entre os 08 segmentos genéticos são possíveis de ocorrer em uma infecção dupla (KIM; WEBSTER; WEBBY, 2018). Variações antigênicas dos vírus influenza originaram as grandes pandemias anteriores: gripe espanhola, gripe asiática, gripe de Hong Kong e mais recentemente a gripe suína em 2009 (NOGUEIRA; PONCE, 2021).

Os hospedeiros de mistura são definidos por indivíduos onde a coinfeção de diferentes vírus influenza possam ocorrer de forma simultânea. A presença de receptores celulares de ácido siálico (SA) ligados á galactose são imprescindíveis para ligação dos vírus influenza as células hospedeiras, os subtipos virais que comumente infectam humanos têm preferência pela ligação com o AS  $\alpha$ ,2,6 (ácido siálico ligado a galactose C6) abundantes no sistema respiratório humano, já os AIVs ligam-se predominantemente ao AS  $\alpha$ 2,3 (ácido siálico ligado á galactose C3) presente no sistema gastrointestinal das aves. Inicialmente acreditava-se que cada receptor fosse exclusivo, onde humanos apresentariam apenas ligações AS  $\alpha$ 2,6, aves AS  $\alpha$ 2,3 e somente suínos detinham ambos receptores viabilizando infecções simultâneas por AIVs e vírus influenza humanos em um mesmo indivíduo; portando eram tidos como único recipiente de mistura (ABDELWHAB; METTENLEITER, 2023; ZHAO; PU, 2022). Atualmente tem-se o conhecimento que diversas espécies animais possuem ambos receptores podendo funcionar como recipientes de mistura entre vírus influenza com diferentes potencialidade e frequência de ocorrência, algumas

espécies suscetíveis incluem: furões, visons, humanos, cães, gatos, patos, entre outras (Figura 4) (ABDELWHAB; METTENLEITER, 2023; ZHAO; PU, 2022).

**Figura 4.** Potenciais recipientes de mistura para *Alphainfluenzavirus* de acordo com a frequência de infecção, contato próximo com humanos, alto número de populações e distribuição de receptores do tipo aviário e humano.



Fonte: Abdelwhab; Mettenleiter (2023).

Existem dois mecanismos de difusão importantes associados aos processos de mutações e rearranjos dos vírus influenza denominados “spillover” e “spillback”. O primeiro mecanismo consiste no transbordamento viral partindo das espécies hospedeiras naturais para outras suscetíveis (aves domésticas e mamíferos). Normalmente ocorre quando subtipos de baixa patogenicidade são introduzidos em populações suscetíveis com alta densidade, ocasionando rápidos processos de evolução viral, principalmente nos genes que codificam as glicoproteínas de superfície. As mutações gênicas adquiridas aumentam as chances das cepas LPAI se tornarem subtipos patogênicos. O processo de “spillback” consiste na transmissão dessas variantes agora de alta patogenicidade para aves silvestres, com potencial de causar doenças e mortalidade (VERHAGEN *et al.*, 2021; WALSH; MOR; HOSSAIN, 2020).

### 2.1.5 Transmissão

As aves aquáticas silvestres podem transmitir os AIVs direta ou indiretamente para outras espécies aviárias, aves domésticas, mamíferos silvestres e domésticos, além de humanos. Os vírus influenza exibem tropismo pelas células do sistema respiratório e intestinal, onde ocorrem as maiores taxas de replicação e excreção (BODEWES; KUIKEN, 2018; FLORES, 2017). Estudo realizado por Germeraad *et al.* (2019), demonstrou por meio de análise quantitativa que infecções causadas por HPAI levam a maiores taxas de eliminação viral no ambiente quando comparadas com LPAI. Assim no primeiro caso as probabilidades de contaminações por via indireta são maiores.

A via fecal-oral compreende a principal forma de propagação dos AIVs no ciclo de transmissão silvestre-doméstico, considerando que aves aquáticas podem excretar partículas virais nas fezes por tempo superior a 20 dias, com pico de eliminação entre o 2º e 4º dia de infecção. (BLAGODATSKY *et al.*, 2021; SPACKMAN, 2020). Essa via de transmissão ocorre predominantemente em habitats de zonas úmidas, como beiras de lagos, rios ou litorais. Nesses locais, grandes quantidades de vírus estão presentes nos excrementos fecais provenientes da avifauna aquática, propiciando que diversas espécies animais se contaminem através da ingestão de água e alimentos contaminados (BODEWES; KUIKEN, 2018; FLORES, 2017). Os vírus influenza de origem aviária mantêm infectividade nas fezes de patos em média 30 dias a temperatura de 4°C e durante 07 dias a 20°C, podendo permanecer infecciosos por longos períodos na água, isso dependerá de fatores como temperatura, pH e salinidade. (BLAGODATSKY *et al.*, 2021; BODEWES; KUIKEN, 2018).

A transmissão indireta ocorre através de fômites, pessoas, insetos ou roedores contaminados com secreções respiratórias ou material fecal contendo partículas virais. Na produção de subsistência e avícola industrial a utilização de camas, esterco e ovos contaminados; além do descarte incorreto de carcaças também são importantes fontes de contaminação (FLORES, 2017).

Além dos movimentos migratórios aviários, a dispersão e transmissão viral dos vírus influenza são favorecidas pelo processo de globalização, que permite a rápida movimentação de pessoas, animais vivos e seus subprodutos para locais distantes do globo em poucas horas. Invariavelmente o tempo de

deslocamento facilitado pela aviação é inferior ao período de incubação da doença, permitindo que pessoas e animais infectados passem despercebidos pela ausência de sinais clínicos (YADAV; SINGH; MALIK, 2020). O comércio de aves vivas, as mudanças na ecologia florestal pela antropização devido á práticas de desflorestamento, urbanização, turismo, exploração e comércio ilegal da vida selvagem são os principais promotores de mudanças climáticas e ecológicas. Essas interferências nos ambientes naturais modificam a biologia comportamental e padrão de movimentação da fauna silvestre, aumentando a interação desta com animais doméstico e o homem (ESPOSITO *et al.*, 2023; YADAV; SINGH; MALIK, 2020).

#### 2.1.6 Sinais clínicos

As manifestações clínicas causadas pelos AIVs variam de acordo com a cepa infectante, espécie hospedeira acometida, idade, sexo, imunidade prévia, e infecções secundárias (FLORES, 2017). Os subtipos de LPAI em aves comerciais cursam com infecções subclínicas ou manifestações clínicas discretas como: diminuição da fertilidade e produção de ovos, postura de ovos deformados, sinais respiratórios leves (tosse, espirros, secreções nasais e oculares), diminuição da ingestão de comida e água. Em galinhas e perus podem ser observados aumento nas taxas de mortalidade. Os sinais clínicos podem ser exacerbados em casos de infecções bacterianas secundárias concomitantes. Aves silvestres invariavelmente apresentam poucos ou nenhum sinal clínico aparente, quando presentes pode-se observar diminuição do ganho de peso e alterações comportamentais (BODEWES; KUIKEN, 2017; SPACKMAN, 2020).

As infecções decorrentes de HPAI geralmente cursam com doença grave em galinhas e perus, culminando em taxas de mortalidade de até 100% no período de 36-48 horas pós infecção (SPACKMAN, 2020). As manifestações clínicas variam de acordo com a cepa viral, mas geralmente produzem sinais clínicos relacionados á lesões nos sistemas respiratório, gastrointestinal e nervoso, ou até mesmo morte súbita sem apresentação de doença clínica (GERMERAAD *et al.*, 2019).

Os sinais clínicos comumente observados em aves domésticas incluem: depressão marcada, tosse, espirros, descargas orais e nasais sanguinolentas, diarreia, edema e/ou cianose em cabeça crista e barbela. As principais

manifestações neurológicas são tremores de pescoço e cabeça, torcicolo, opistótono, nistagmo, paresia ou paralisia das asas, convulsões e incoordenação motora (FLORES, 2017).

Aves poedeiras infectadas apresentam queda marcante na produção, além da postura de ovos despigmentados e deformados (CIRIÓN; INGLESÍAS, 2023).

#### Sinais clínicos em humanos

Os vírus influenza aviária ocasionalmente são responsáveis por infecções na espécie humana, levando a apresentação de sintomas leves, graves ou até taxas consideráveis de óbitos. A cepa viral envolvida na infecção, o estado imunológico do paciente e a presença de infecções secundárias são os principais fatores determinantes da intensidade e gravidade dos sinais clínicos, assim como a evolução da enfermidade. Os subtipos H5 e H7 são capazes de promover quadros clínicos graves associados a altas taxas de letalidade (40%-60%), onde a sintomatologia apresentada consiste em quadros pneumonia e síndrome do desconforto respiratório. Vírus LPAI geralmente causam sinais clínicos brandos como febre, conjuntivite, tosse e coriza (WANG *et al.*, 2021).

#### 2.1.7 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo de influenza aviária obrigatoriamente deve ser realizado por um laboratório oficial, uma vez que se trata de uma doença potencialmente zoonótica de importância mundial e de notificação obrigatória ao MAPA e a WAOH. No Brasil, os diagnósticos laboratoriais comumente realizados em granjas avícolas em casos suspeitos incluem (FLORES, 2017; MAPA, 2020):

##### Isolamento viral:

O isolamento viral pode ser realizado em ovos embrionados de galinhas ou em cultura celular em laboratórios com certificação de biossegurança para manipulação de patógenos que apresentem alto risco biológico. A titulação viral pode ser efetuada conjuntamente com a técnica de isolamento. Esse método diagnóstico é altamente sensível; contudo, não é específico para o Vírus Influenza do tipo A, necessitando de confirmação com testes de alta especificidade como: ensaio de inibição da hemaglutinação (HI), imunoensaio de

antígeno, ensaio de imunodifusão em gel de ágar ou transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR) (SPACKMAN, 2020).

Preferencialmente, deve-se coletar para o isolamento viral amostras de secreções orofaríngeas e cloacais de aves vivas com o auxílio de swabs estéreis. Para diagnóstico em animais mortos deve-se coletar vísceras como traqueia, pulmão, intestino, rim, fígado, coração, baço e cérebro. Todas as amostras biológicas devem ser acondicionadas em meio de preservação do material genético (RNA) seja para transporte ou armazenamento. Os meios, obrigatoriamente, devem ser estéreis, com pH neutro, e precisam conter substâncias balanceadas, como eletrólitos, carboidratos e aminoácidos essenciais. Além disso, a adição de antibióticos é essencial para prevenir que haja colonização bacteriana (MAPA, 2023; FLORES, 2017). Conforme as diretrizes do MAPA (2023), o período de viabilidade das amostras, é de no máximo 96 horas quando mantidas sob refrigeração (temperatura de 2°C a 8°C). Caso haja necessidade de armazenamento por período mais longo, as amostras devem ser congeladas a -80°C ou em temperaturas inferiores.

O método de isolamento viral envolve a inoculação da amostra suspeita na cavidade alantoide de ovos embrionados de galinhas, com idade entre 09 e 11 dias, que se encontram livres de patógenos específicos (SPF) ou livres de anticorpos. Após a inoculação, os ovos são incubados a 37°C por um período de 04 a 07 dias, sendo observados diariamente para detectar morte embrionária. Todos os ovos inoculados, independentemente de apresentarem embriões mortos ou vivos, são resfriados a uma temperatura de 4°C por algumas horas. Posteriormente, o líquido alantoide é coletado e testado por meio das técnicas de hemaglutinação ou RT-qPCR para confirmar a presença de AIVs. Após essa confirmação, os isolados devem ser submetidos a testes para determinar sua patogenicidade, seguindo os protocolos estabelecidos pela WOA (WOAH, 2021; SPACKMAN, 2020).

#### Determinação do índice de patogenicidade intravenoso (IPIV)

Conforme a WOA (2021), a determinação da patogenicidade em aves deve ser realizada em qualquer isolado de AIV através do IPIV. O protocolo de realização do teste consiste na inoculação intravenosa (IV) de fluido alantoide fresco em 10 galinhas SPF, com idade entre 04 a 08 semanas. O fluido alantóide

utilizado deve ser isento de Avulavírus aviário e outros agentes infecciosos, apresentando título de hemaglutinação superior a 1/16. Em seguida, as aves devem ser observadas em intervalos de 24 horas ao longo de 10 dias consecutivos, para determinação da pontuação conforme descrito na Tabela 1.

O IPIV é obtido através da soma da pontuação média obtida pela análise individual das aves no período de 10 dias, dividida pelo total de observações. Isolados que apresentarem IPIV superior a 1,2 ou causarem mais de 75% de mortalidade dentro dos 10 dias de avaliação são considerados HPAI (WOAH, 2021).

**Figura 5.** Fórmula do cálculo para determinação do IPIV.

$$\text{Índice} = \frac{\text{Resultado médio por ave}}{\text{Número de observações}}$$

Fonte: Elaborada pela autora, com base em dados disponibilizados pelo MAPA (2023).

**Tabela 1.** Avaliação do IPIV em aves de acordo com WOA (2021).

Pontuação	Apresentação clínica da ave
0	Clinicamente normal
1	Manifestação clínica de doença*
2	Gravemente doente**
3	Ave morta

\*Manifestação clínica de doença, determinado quando a ave apresentar um dos seguintes sinais: alterações no padrão respiratório, depressão, diarreia, cianose, edema de face e/ou cabeça, sinais nervosos.

\*\*Ave gravemente doente, ou seja, apresentando mais de um dos sinais clínicos descritos acima.

Fonte: Elaborada pela autora, com base nas informações disponibilizadas pela WOA (2023)

## Diagnóstico molecular

Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase (RT-

qPCR):

A aplicação da biologia molecular para detecção de doenças virais com grande impacto na sanidade animal e humana tem sido amplamente utilizada como método de vigilância epidemiológica, investigação de surtos, diagnóstico e pesquisa. A técnica de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para detecção dos vírus influenza permite a obtenção de resultados quantitativos em poucas horas, além da possibilidade de testar um grande número de amostras simultaneamente. A RT-qPCR demonstra elevadas taxas de sensibilidade e especificidade quando são utilizados iniciadores e sondas direcionados para detecção de nucleoproteínas ou matriz (M1) dos AIVs (LACONI *et al.*, 2020; SPACKMAN, 2020).

Considerando-se que a influenza aviária é uma doença zoonótica a utilização da RT-qPCR oferece um nível superior de biossegurança quando comparada a outros métodos diagnósticos, uma vez que a inativação viral ocorre no início do processamento da amostra, durante a extração do material genético (SPACKMAN, 2020).

Sequenciamento de nova geração (NGS- Next Generation Sequencing)

Amostras positivas na RT-qPCR precisam ser confirmadas por meio da amplificação de oito segmentos do genoma do AIV (ZHOU *et al.*, 2009). Após a amplificação, submete-se o produto ao sequenciamento de nova geração, pois é uma técnica molecular de alto rendimento, que permite realizar sequenciamentos genéticos simultaneamente de milhões de pequenos fragmentos de DNA ou cDNA (vírus com material genético RNA). Baseado na análise direta de ácidos nucleicos previamente extraídos, essa metodologia apresenta algumas características vantajosas quando se trabalha com agentes altamente patogênicos, como melhorias na velocidade do sequenciamento, alto rendimento, obtenção de informações genômicas mais abrangentes e elevada sensibilidade, esta última se deve a maior especificidade nas leituras das sequências geradas pelo NGS em relação ao patógeno alvo (WANG *et al.*, 2022; PARK *et al.*, 2020). O GNS vem sendo utilizado como teste diagnóstico complementar para diversos agentes virais, incluindo os *Alphainfluenzavirus* (KIM *et al.*, 2029). Apesar de ser uma técnica molecular relativamente nova, é realizada em alguns laboratórios oficiais certificados, universidades públicas e

federais e projetos de pesquisas que visam o monitoramento de vírus emergentes.

Como este ensaio permite a análise de informações completas dos oito segmentos genômicos dos AIVs de uma só vez, é possível a identificação dos subtipos virais de forma sensível e precisa para o diagnóstico, assim como a determinação da virulência do subtipo viral presente na amostra (PARK *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2019). O NGS também é eficiente na identificação de novos vírus, caracterização de novas variantes e pode fornecer informações críticas relacionadas a mutações específicas nos vírus influenza que podem estar associadas ao aumento da virulência ou resistência a tratamentos, este último geralmente direcionado à espécie humana (HAVASI *et al.*, 2022; ZHAO *et al.*, 2016). Essas informações, obtidas pela aplicação do NGS são de extrema importância para o monitoramento epidemiológico de vírus altamente mutáveis (HAVASI *et al.*, 2022).

#### 2.1.8 Situação global da influenza aviária

Em 2020, teve início uma extensa epidemia global de vírus influenza H5N1, clado 2.3.4.4b, que persiste até o momento atual. Essa estirpe viral altamente patogênica disseminou-se da Ásia para toda a Europa e, posteriormente, para os continentes Africano e Americano, causando surtos com mortalidade massiva em aves silvestres e domésticas (TIAN *et al.*, 2023). Infecções sem precedentes em diversas espécies de mamíferos silvestres também têm sido amplamente relatadas, especialmente em mesocarnívoros e espécies marinhas (GILBERTSON; SUBBARAO, 2023). Em outubro de 2022, o HPAI (H5N1) adentrou a América do Sul, espalhando-se rapidamente ao longo da costa do Pacífico causando a morte de mais de 20.000 leões marinhos sul-americanos (LEGUIA *et al.*, 2023). A propagação viral se estendeu, alcançando a Terra do Fogo em agosto de 2023, aumentando de forma alarmante o risco da disseminação viral para a Península Subantártica e Antártica. Essas regiões possuem uma biodiversidade única e abrigam densas colônias de reprodução de aves e mamíferos marinhos. O impacto que o H5N1 pode causar na ecologia oceânica tem uma proporção inimaginável (SCAR, 2023).

Em outubro de 2023, o HPAI H5N1 chegou a Antártida, causando a morte de várias espécies, incluindo elefantes-marinhos, focas, skuas marrons, gaivotas

e andorinhas-do-mar. Atualmente, somam-se 15 surtos confirmados de HPAI nessas regiões. Prevê-se a ocorrência de falhas reprodutivas e extinção de muitas espécies imunologicamente suscetíveis a infecção, principalmente porque essa é a primeira que um vírus influenza aviário alcança essas regiões tão distintas do mundo (SCAR, 2024; CDC, 2023).

Em relação a população humana, a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) registra, desde o ano de 2021 até setembro de 2023, 08 casos de infecções em humanos pelo H5N1 (clado 2.3.4.4b). Em janeiro de 2023, foi notificada a WOAHA o primeiro caso de infecção por esse subtipo de AIV em humano na América Latina. Em nenhum dos casos registrados houve comprovação de transmissão sustentada entre humanos (BRUNO *et al.*, 2023).

A disseminação global do H5N1 (clado 2.3.4.4b) tem gerado grande preocupação na comunidade científica. Além da possibilidade de extinção total de espécies ameaçadas, as infecções em mamíferos terrestres aumentam potencialmente as chances de ocorrerem rearranjos virais entre diferentes subtipos de Vírus Influenza A, permitindo a adaptação e propagação entre mamíferos, incluindo humanos, podendo desencadear uma nova pandemia (GILBERTSON; SUBBARAO, 2023; LEGUIA *et al.*, 2023).

Alguns processos evolutivos e mutacionais são necessários para que ocorram transmissões sustentadas do vírus influenza aviário entre humanos. Essas adaptações envolvem a mudança de afinidade por receptores de AS  $\alpha 2,3$  para AS  $\alpha 2,6$  que são predominantes no trato respiratório humano. Além da capacidade de replicação em ambientes com temperaturas relativamente baixas, considerando que no sistema respiratório superior humano a temperatura é de aproximadamente 33°C, enquanto os AIVs se replicam em temperaturas mais elevadas, variando de 41°C a 42°C, o que correspondente á temperatura do sistema gastrointestinal das aves (LI *et al.*, 2019).

Ao longo dos anos, os AIVs têm causado prejuízos econômicos em muitos países, representando um grande desafio sanitário para produção comercial de aves. No entanto, a atual situação mundial de disseminação do subtipo H5N1 nunca foi registrada antes. De acordo com o Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (2023), desde janeiro de 2022 até outubro de 2023, foram registrados pelos países membros da WOAHA mais de 17.000 surtos em animais. As perdas econômicas na produção avícola industrial, em pequenas criações

comerciais ou de subsistência decorrentes dessa epidemia de influenza aviária, são as maiores já registradas na história. Estima-se que mais de 204 milhões de aves morreram ou foram abatidas em decorrência de infecções pelo H5N1 (SHI *et al.*, 2023).

#### 2.1.9 Influenza aviária no Brasil

No Brasil, cepas de baixa patogenicidade já foram detectadas circulando em aves silvestres em alguns estados do país, como o subtipo H6N1, H2N2, H9N2 e H12N5 no Parque Nacional da Lagoa do Peixe, no estado do Rio Grande do Sul (ARAUJO *et al.*, 2018). Também foram feitas detecções virais do subtipo H11N9 na região Amazônica (ARAUJO *et al.*, 2014). Um estudo sorológico realizado por Bourscheid *et al.* (2020) detectou anticorpos para os subtipos H1, H4, H6 e H14 em aves domésticas criadas próximas a locais de escalada de aves migratórias no estado de Mato Grosso, indicando possíveis circulações virais nessa região.

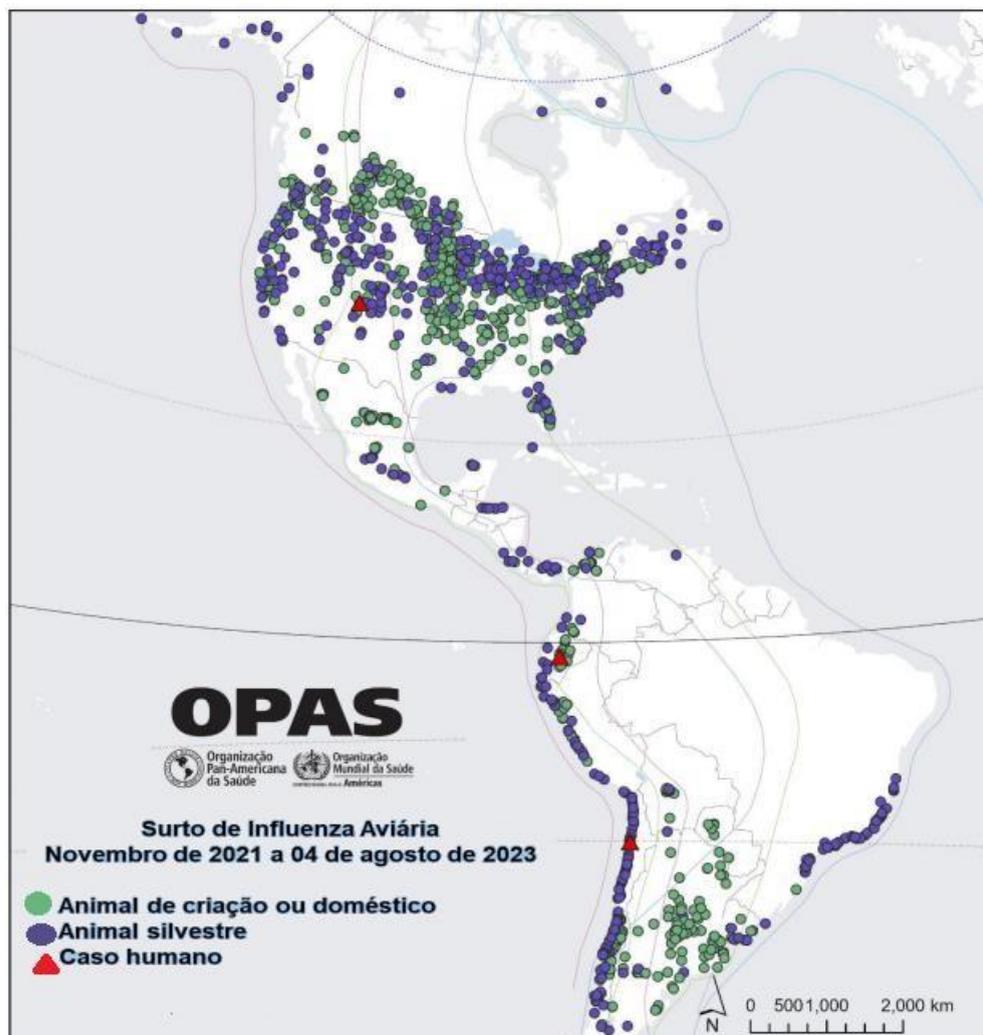
Até abril de 2023, o Brasil era considerado um país livre de influenza aviária de alta patogenicidade, não havendo detecções da circulação de HPAI em território, tampouco registros anteriores de surtos decorrentes de AIV HPAI, seja em granjas avícolas, de subsistência ou na avifauna silvestre (MAPA, 2023). A partir de maio de 2023, a situação mudou no país após a primeira detecção da cepa H5N1 em aves silvestres migratórias no estado do Espírito Santo. A análise filogenética da cepa viral H5N1 (clado 2.3.4.4b), isolada de espécimes de *Thalasseus acutifidus* (andorinha-do-mar) provenientes de focos no Espírito Santo, apresentou alta semelhança com o subtipo viral isolado no Chile e Peru (99%) (ARAUJO *et al.* 2024; REISCHAK *et al.*, 2023).

O surto de HPAI (H5N1), iniciou no Hemisfério Norte em julho de 2022, promovendo grandes surtos, principalmente em aves marinhas. Com a rápida propagação viral ainda no mesmo ano, o vírus alcançou países da América Central e do Sul, disseminando-se rapidamente para a região Sul ao longo da costa do Pacífico, com surtos detectados inicialmente no Peru e no Chile (ARAUJO *et al.* 2024; SCAR, 2023; REISCHAK *et al.*, 2023). De acordo com o Comitê Científico sobre Pesquisa Antártica (SCAR) (2023), desde a entrada do H5N1 na América do Sul, o vírus se espalhou por mais de 6.000 km em um curto período de três meses, causando a morte de mais de 500.000 aves marinhas.

Portanto, acredita-se que esse subtipo viral tenha entrado no Brasil através de aves migratórias que utilizam a rota do Pacífico, uma vez que os surtos confirmados até o momento predominam em regiões litorâneas e em aves aquáticas (Figura 6) (REISCHAK *et al.*, 2023).

De acordo com o MAPA (2023), no Brasil, soma-se o total de 155 focos confirmados de HPAI (H5N1), predominantemente em estados litorâneos, dos quais 152 focos foram notificados em aves silvestres e 03 em aves de subsistência. Até o presente momento, nenhum caso foi registrado em granjas avícolas, e o país mantém o status de livre de influenza aviária na avicultura comercial.

**Figura 6.** Surtos de influenza aviária regiões das Américas, de novembro de 2021 até 4 de agosto de 2023.



Fonte: Adaptado de OPAS (2023).

## 2.2 Movimentos migratórios na disseminação de influenza aviária

A migração aviária intracontinental ou intercontinental é essencial para sobrevivência de muitas espécies ao redor do mundo. Esses deslocamentos sazonais permitem que as aves aproveitem os recursos disponíveis ao longo de suas rotas de voo em diferentes regiões e épocas do ano. Essas migrações são realizadas principalmente em busca de locais com alta disponibilidade de alimentos, condições climáticas mais favoráveis, seja para fugir de invernos rigorosos ou secas prolongadas; além da busca por áreas ideais para reprodução e nidificação (ICMBIO, 2022; SINGH *et al.*, 2020).

As aves silvestres realizam diferentes padrões de migração sazonal e são comumente caracterizadas como migrantes de longa e curta distância, de acordo com a extensão de suas rotas de voo. Os migrantes de longa distância compreendem espécies que atravessam continentes e/ou percorrem diferentes biomas. Outras aves migram apenas curtas distâncias, movendo-se dentro de um continente ou bioma, sendo denominadas migrantes de curta distância. Há também espécies ou populações que não realizam movimentos migratórios significativos permanecendo em uma determinada área geográfica durante todo o ano ou a maior parte dele, essas espécies recebem a denominação de aves residentes (HAHN *et al.*, 2022; ICMBIO, 2022; SOMVEILLE *et al.*, 2021).

As aves aquáticas migratórias são amplamente reconhecidas como importantes agentes na propagação global de patógenos virais, inclusive dos *Alphainfluenzavirus*. Aproximadamente, 1.800 das 11.197 espécies de aves conhecidas mundialmente e registradas no *BirdLife International* são migratórias. Muitas dessas pertencem às ordens Anseriformes e Charadriiformes, nas quais se encontram espécies conhecidas por realizar migrações de longa distância, sendo frequentemente associadas à disseminação, amplificação e manutenção de AIVs nos sítios de escala e internada (SINGH *et al.*, 2020; LISOVSKI *et al.*, 2018).

Nas localidades utilizadas para escala e internada, é comum ocorrerem agregações em alta densidade de espécies e populações de aves geograficamente distintas. Esse compartilhamento ambiental em zonas úmidas, como lagos, lagoas, praias, baías e margens de rios, favorece a ocorrência de transmissão viral através do contato direto entre indivíduos e, principalmente, pela via fecal-oral, pois as partículas virais dos AIVs presentes nas fezes de aves

infectadas podem permanecer viáveis no ambiente por longos períodos. Essa via de transmissão também está diretamente relacionada com a manutenção viral em ambientes selvagens, permitindo a infecção entre populações aviárias separadas espacial ou temporalmente (BLAGODATSKI *et al.*, 2021; ARAUJO *et al.*, 2018; LICKFETT, *et al.*, 2018).

Além disso, esses locais estão intimamente relacionados aos processos evolutivos dos vírus influenza, uma vez que a aglomeração da fauna silvestre aumenta as chances de trocas de cepas virais interespecies, facilitando os processos mutacionais e rearranjos genéticos entre diferentes subtipos (ZHANG *et al.*, 2023; LISOVSKI *et al.*, 2018)

Anualmente, o Brasil recebe uma ampla variedade de aves que realizam movimentos migratórios sazonais, vindas da América do Norte em direção à América do Sul e vice-versa. Esses migrantes que chegam ao Brasil são denominadas de duas maneiras, de acordo com a sua origem: aves migratórias Setentrionais (Neárticas), que possuem seu sítio reprodutivo no Hemisfério Norte, e aves migratórias Meridionais (Neotropicais), com sítios reprodutivos ao sul da América do Sul (PALUDO *et al.*, 2022; ICMBIO, 2019). O primeiro grupo é composto pelas grandes migrantes, com espécies que cruzam hemisférios durante suas rotas de voos, sendo capazes de se deslocarem por mais de 20 mil quilômetros partindo de seus pontos de reprodução no Ártico até chegarem ao Brasil geralmente pela costa Atlântica e pela Amazônia, dentro dessa rota atravessam a região central do país através do Pantanal em direção ao sul do continente para alcançarem seu destino final na Patagônia (Argentina e Chile), principal ponto de concentração dessas aves migratórias (BARBIERI; ESPARZA, 2023; ICMBIO, 2022).

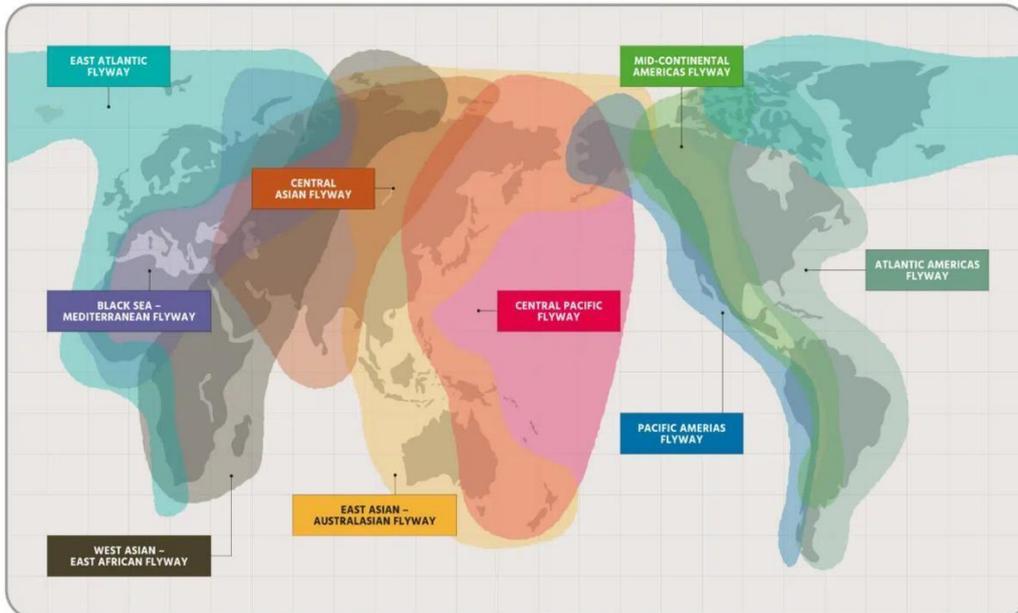
As aves Meridionais (Neotropicais), realizam deslocamentos partindo do continente Antártico, do extremo Sul da América do Sul e em menor proporção populacional das regiões andinas. Essas espécies são migrantes de curta distância, e suas rotas de voo tem como destino regiões a oeste e norte do Brasil, esta última em direção à bacia amazônica. Ainda há poucas informações detalhadas a respeito das rotas utilizadas por esse grupo de aves; entretanto, sabe-se que adentram o território brasileiro pelo Oeste e, em sua maioria, pela região sul, utilizando a Rota Atlântica, uma vez que são predominantemente aves costeiras (SILVEIRA *et al.*, 2021; ICMBIO, 2019).

No Brasil, as aves migrantes encontram várias opções de sítios de invernada com grande disponibilidade de alimentos e clima favorável. Os principais sítios de invernada incluem a Ilha do Carangueijo (Maranhão), a Lagoa do Peixe (Rio Grande do Sul), a Coroa do Avião (Pernambuco) e o Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul) (ICMBIO, 2019; NUNES; TOMAS, 2008). De acordo com ICMBio (2022) o Brasil abriga mais de 13% da diversidade de espécies do mundo, sendo o terceiro país com maior número em variedade de aves. Atualmente, no Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, constam registradas um total de 1.971 espécies de aves brasileiras. Dentre essas, 216 (10,9%) realizam algum tipo de migração, onde 141 espécies são migratórias e 75 parcialmente migratórias, o que significa que apenas parte de suas populações se desloca sazonalmente (ICMBIO, 2022; PACHECO *et al.*, 2021).

As rotas migratórias intercontinentais, conhecidas como “*Flyways*”, desempenham um papel vital na jornada das aves entre suas áreas de reprodução e invernada. Globalmente, existem nove principais *Flyways* que conectam diferentes continentes e ecossistemas diversos (Figura 7). No Brasil, há cinco importantes rotas migratórias que se conectam com as rotas intercontinentais (Figura 8), sendo essenciais para os deslocamentos das aves neárticas e setentrionais. Entre essas cinco rotas que se estendem pelo território brasileiro, duas atravessam a região do Brasil Central: a Rota do Brasil Central, uma divisão da Rota Atlântica, e a rota Amazônia Central/Pantanal (BIRDLIFE, 2023; ICMBIO, 2019; INSTITUTO NEOENERGIA, 2020).

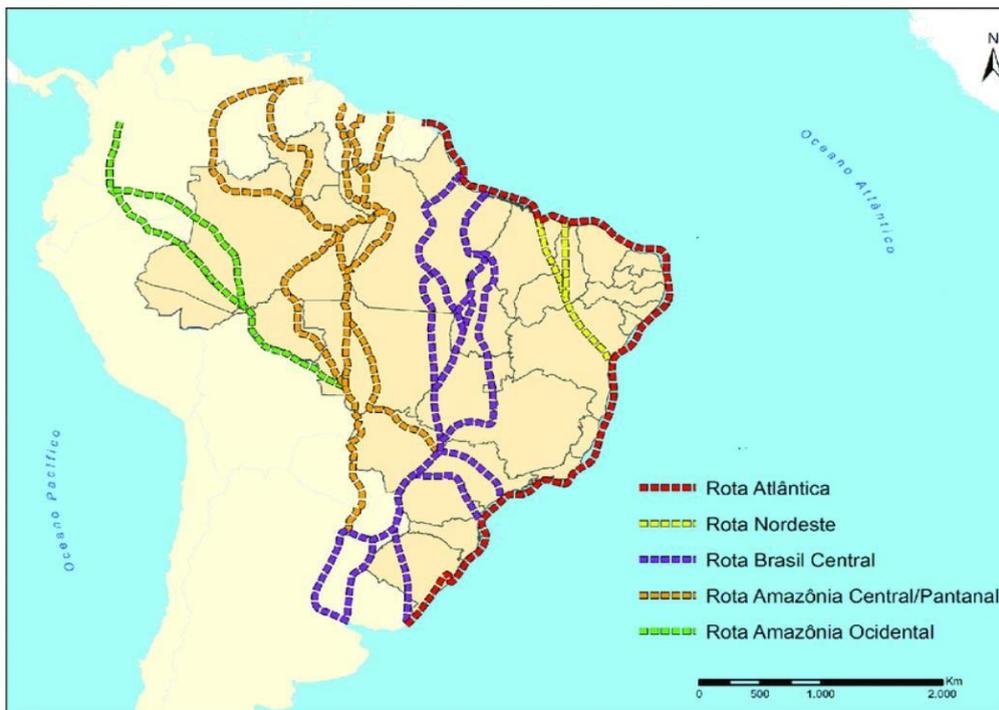
Na região Centro-Oeste do Brasil, especificamente nos estados do Mato Grosso (MT) e Mato Grosso do Sul (MS), destacam-se três importantes locais para as aves migratórias: as Praias do Rio Paraguai (MT), as Praias do Rio Araguaia (MT) e o Complexo do Pantanal (MT e MS). Essas áreas são reconhecidas pelo Departamento de Saúde Animal como sítios de vigilância ativa para a detecção dos vírus da influenza aviária e da doença de Newcastle (MAPA, 2022). O Pantanal, em particular, é uma região crucial para as aves migrantes no Brasil, e de acordo com Nunes *et al.* (2021), aproximadamente um terço (1/3) das espécies migratórias de ocorrência no território brasileiro utilizam essa vasta planície de inundação como ponto de escala ou de invernada.

**Figura 7.** Mapa das nove principais rotas migratórias aéreas utilizadas pelas aves migrantes em todo o mundo.



Fonte: *BirdLife International* (2023).

**Figura 8.** Rotas migratórias aviárias que atravessam o Brasil, conectando-o com as rotas intercontinentais (*Flyways*).



Fonte: *ICMBio* (2016).

### 2.3 *Charadrius collaris*

A espécie *Charadrius collaris* (Vieillot, 1818) também denominada como batuíra-de-coleira e batuíra-da-costa, pertence a ordem Charadriiformes, subordem Charadrii, família Charadriidae e gênero *Charadrius* (WIKI AVES, 2022; SIBBR, 2020).

Essa espécie é caracterizada por pequenas aves limícolas que habitam áreas úmidas. Apresentam ampla distribuição geográfica em regiões tropicais e subtropicais, sendo encontradas em quase todos os países da América do Sul, além dos Estados Unidos da América, México e Panamá (Figura 9) (WIERSMA; KIRWAN, 2023; OLIVEIRA; RECHETELO; MESTRE, 2022; PEREIRA, 2017). No Brasil, existem registros de observações da espécie em todos os seis biomas do país (Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pantanal e Pampa), destacando a sua notável adaptação a uma variedade de ambientes naturais. (Figura 10) (WIKI AVES, 2022).

**Figura 9.** Distribuição geográfica da espécie *Charadrius collaris*.



Fonte: União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) (2020).

**Figura 10.** Biomas brasileiros onde foram registradas a ocorrência da espécie *C. collaris*. Os pontos vermelhos no mapa indicam as observações registradas, mas não estão relacionadas a concentração da espécie nos estados.



Fonte: Wiki Aves (2022).

Consideradas aves de pequeno porte, as batuíras-de-coleira medem entre 14 a 16 centímetros de comprimento e pesam, em média, de 25,8 a 42 gramas (SOUZA *et al.*, 2023; WIERSMA; KIRWAN, 2023). Possuem bico preto e a fronte branca com uma mancha preta no alto da cabeça. As regiões de garganta, peito e ventre também exibem coloração branca, entretanto, na região mediana da plumagem, apresentam uma faixa peitoral preta, característica importante que as distinguem de outras aves do gênero *Charadrius*. A plumagem da região dorsal é ligeiramente ferrugínea, e a cauda é de coloração castanho-escuro. As pernas são compridas e de tonalidade clara na cor rosa (Figura 8). Os machos e as fêmeas não possuem dimorfismo sexual de plumagem, contudo, os machos podem apresentar cores mais brilhantes (SOUZA *et al.*, 2023; COWELL; HAIG, 2019; CINTRA, 2014). Uma observação importante é que nas aves jovens, a faixa peitoral preta e a mancha na cabeça estão ausentes. Os espécimes jovens exibem manchas laterais marrom-amareladas e plumagem amarelada na parte superior (WIERSMA; KIRWAN, 2023).

**Figura 11.** Ave da espécie *Charadrius collaris*. A fotografia do exemplar foi obtida durante atividade de captura de aves silvestres, pela equipe de ornitólogos do projeto PREVIR/MCTI, no estado de Mato Grosso, Brasil. Destaca-se a observação da faixa preta na região do peito, característica marcante da espécie (seta preta).



Fonte: Ma. Elaine Bueno. Laboratório de Ecologia de Aves da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT).

As batuíras-de-coleira geralmente são observadas solitárias ou em casais. Habitam locais como praias costeiras arenosas, bancos de areia de rios e baías, campos inundáveis e brejos. Essas aves possuem populações predominantemente sedentárias, no entanto, há registros de movimentos sazonais de curto alcance, já documentados na Venezuela e no litoral norte do Brasil (SOUZA *et al.*, 2023; COWELL; HAIG, 2019). No Pantanal brasileiro algumas populações de *C. collaris* realizam deslocamentos dentro ou fora do país durante os períodos de enchentes. Esses movimentos migratórios de curto alcance, especialmente em resposta às mudanças sazonais nos níveis de água, demonstram a notável capacidade adaptativa das batuíras-de-coleira às condições ambientais de seus habitats. (DEUS; SCHUCHMANN; MARQUES, 2020; NUNES; TOMAS, 2008).

Essa espécie não constrói ninhos, realizando a postura dos ovos em bancos de areia. Geralmente é feita a postura de apenas dois ovos, estes possuem coloração creme com manchas e pintas pretas (SOUZA *et al.*, 2023; WIKI AVES, 2022).

A ecologia de forrageamento das batuíras segue a estratégia denominada

“run-stop-peck” (“correr-parar-bicar”), uma característica ancestral de forrageamento das aves limícolas que otimiza o uso de energia durante o processo de alimentação (WIERSMA; KIRWAN, 2023). Em outras palavras, as batuíras realizam movimentos de correr, fazem uma parada para escaneamento visual das presas e depois as capturam rapidamente. Pequenas presas são engolidas inteiras, enquanto as maiores são desmembradas por picadas, e os pedaços consumidos posteriormente (COWEL; HAIG, 2019). A composição da dieta alimentar é baseada em insetos, pequenos crustáceos e vermes marinhos. (CINTRA, 2014; WIERSMA; KIRWAN, 2023).

Devido as suas características ecológicas e seus deslocamentos sazonais o *Charadrius collaris* é uma importante espécie a ser monitoradas para detecção de novos vírus.

## 2.4 Doença de Newcastle

### 2.4.1 Etiologia

A doença de Newcastle é causada por cepas virulentas do *Avulavírus aviário sorotipo 1* (AAVv-1) também denominado *Paramyxovirus aviário sorotipo 1* (APMV-1) ou vírus da Doença de Newcastle (NDV). Esse patógeno representa um dos principais desafios para o controle sanitário na avicultura industrial, acarretando altos custos com medidas preventivas e de biossegurança (HICKS *et al.*, 2019).

A disseminação do NDV em granjas avícolas acarreta significativos prejuízos econômicos, resultantes das elevadas taxas de morbidade e mortalidade. Aves comerciais afetadas geralmente apresentam quedas no desenvolvimento, redução na produção de ovos ou postura de ovos deformados. Infecções provocadas por cepas altamente virulentas cursam com sinais clínicos respiratórios, gastrointestinais e/ou alterações nervosas graves, levando a altas taxas de mortalidade, que podem chegar á 100%. Além disso, a ocorrência de surtos resulta em restrições comerciais e embargos às exportações de carne de frango e seus subprodutos (WOAH, 2021; BROWN; BEVINS, 2017).

A doença de Newcastle faz parte do grupo de doenças de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial e á WOA, estando listada no Código Sanitário de Animais Terrestres (WOAH, 2021). Possui distribuição mundial, ocorrendo de forma endêmica na Ásia, África e Oriente Médio, assim como em

algumas regiões da América Central e do Sul, principalmente em aves domésticas (BROWN; BEVINS, 2017). No Brasil, é uma doença de controle oficial pelo MAPA sendo enquadrada no Plano Nacional de Sanidade Avícola, juntamente com a Influenza Aviária, uma vez que ambas enfermidades são as principais responsáveis pela Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves (MAPA, 2022, BAPTISTA *et al.*, 2021)

A primeira descrição do NDV em território brasileiro ocorreu no ano de 1953, no estado do Amapá. A introdução do vírus no país deu-se através de carcaças de aves congeladas provenientes dos Estados Unidos, e desde então, esse patógeno continua a circular no país em baixa incidência em aves silvestres (BAPTISTA *et al.*, 2021; LEITE *et al.*, 2020). As últimas notificações de surtos causados pelo NDV em território nacional ocorreram no ano de 2006, em aves comerciais no estado do Rio Grande do Sul, criações de subsistência no Amazonas e pombos no estado de Mato Grosso (MAPA, 2022; BAPTISTA *et al.*, 2021; FLORES, 2017). Atualmente, no Brasil, existem áreas livres da Doença de Newcastle, e a circulação desse agente viral é controlada através de protocolos preventivos de vacinação realizados sistematicamente em estabelecimentos avícolas. No entanto, esporadicamente, são reportados pequenos surtos em criações de subsistência ou com sistemas semi-intensivos (MAPA, 2022; FLORES, 2017).

O *Paramyxovirus aviário sorotipo 1* é um vírus de caráter zoonótico, sendo responsável por raras infecções com manifestações clínicas em humanos. Quando essas ocorrem, apresentam-se como conjuntivite unilateral ou bilateral, lacrimejamento e edema nas pálpebras. Essas infecções geralmente têm caráter autolimitante e não causam lesões na córnea (THOMAZELLI *et al.*, 2021). Devido à sua característica oncolítica, o NDV tem sido amplamente estudado como ferramenta para o tratamento de câncer em humanos. As vantagens da utilização desse vírus incluem sua capacidade de replicação eficiente e seletiva em células tumorais, bem como a indução da ativação do sistema imunológico, auxiliando na resposta antitumoral. Outra característica importante é a impossibilidade do vírus se integrar ao genoma celular humano, uma vez que o processo de replicação viral ocorre no citoplasma. Os efeitos colaterais da imunoterapia antitumoral utilizando o NDV são semelhantes às infecções por gripe (MENG *et al.*, 2021; BURMAN; PESCI; ZAMARIN, 2020).

Os Avulavirus aviários pertencem à família *Paramyxoviridae* e são classificados em 12 sorotipos diferentes (APMV-1 a APMV-2). O APMV-1 circula nas populações aviárias em maior proporção, configurando o sorotipo de maior importância epidemiológica e econômica, uma vez que é o agente etiológico causador da doença de Newcastle (GOGOI; GANAR; KUMAR, 2017). As partículas virais são esféricas e filamentosas, com dimensões que variam entre 100 e 1250nm de diâmetro. O genoma é constituído por ácido ribonucleico (RNA) de fita simples, com sentido negativo e não segmentado, envolto por um nucleocapsídeo helicoidal simétrico, que, por sua vez, é revestido por um envelope de bicamada lipídica (MAO *et al.*, 2022). O genoma do AAVV-1 contém seis proteínas estruturais (Figura 12) e duas proteínas não estruturais que atuam em conjunto nos processos de invasão da célula hospedeira e multiplicação viral. Cada proteína desempenha funções únicas nesses processos, como serão descritas a seguir de acordo com Flores (2017) e MAO *et al.* (2022):

- Nucleoproteína do nucleocapsídeo (NP): também denominada de proteína N, é encontrada em abundância nos vírions. Forma o complexo de nucleocapsídeo helicoidal em torno do RNA genômico, exercendo a função de proteção do material genético contra a degradação por nucleases. Além disso, participa do processo de empacotamento do genoma nas novas partículas virais formadas.

-Fosfoproteína (P): desempenha um papel essencial no complexo replicase, sendo necessária para a ligação da RNA polimerase à ribonucleoproteína (RNP). Portanto, participa dos processos de replicação e transcrição viral.

-Proteína de matriz (M): preenche o espaço entre o nucleocapsídeo e o envelope, compreendendo a proteína mais abundante nos vírions. Embora a exata função dessa proteína não esteja claramente elucidada, sabe-se que ela participa de forma vital na interação entre o nucleocapsídeo viral e a membrana celular hospedeira durante os processos de morfogênese, maturação e brotamento.

-Glicoproteína de fusão (F): exerce função crucial no processo de fusão entre o envelope viral e a membrana celular, o que permite a entrada do nucleocapsídeo no citoplasma. Além disso, é o principal componente viral determinante da virulência das cepas de NDV.

-Hemaglutinina-neuraminidase (HN): glicoproteína multifuncional localizada no envelope viral, projetadas na forma de espículas. É responsável pelo

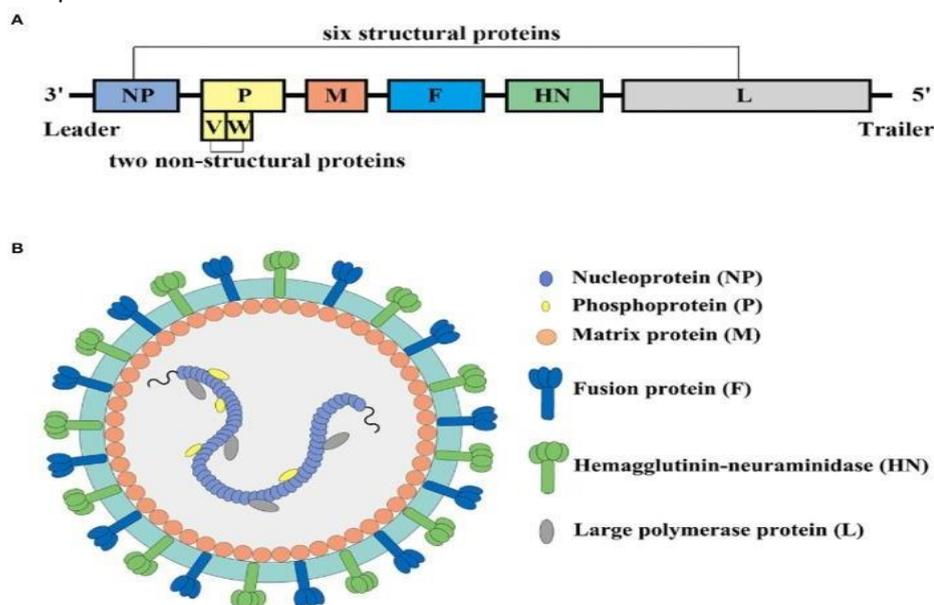
reconhecimento de receptores de ácido siálico nas células hospedeiras, e pela hidrólise das ligações entre a hemaglutinina e o AS das partículas virais recém-formadas.

-RNA polimerase (L): é a maior proteína do genoma viral, embora seja encontrada em menor quantidade. Compreende o último gene a ser transcrito durante a replicação e possui todas as atividades catalíticas necessárias para a replicação viral. Atua também na modulação da virulência dos vírus da Doença de Newcastle.

As proteínas não estruturais são denominadas W e V. A proteína V proporciona o ambiente favorável para que ocorra a replicação viral através da inibição da secreção e apoptose do interferon tipo I (IFN) da célula hospedeira. Essa atividade permite que o vírus escape da resposta imune inata do hospedeiro. A função da proteína W ainda não está esclarecida (ZHANG; DING; XU, 2023; MAO *et al.*, 2022).

Os *Avulavírus aviários* são categorizados em duas classes (classe I e classe II), com base em análises filogenéticas, e subdivididos em genótipos e clados. Os vírus da classe I são predominantemente de baixa virulência e são isolados de aves silvestres. Os vírus da classe II englobam cepas não patogênicas e cepas patogênicas, abrigando a maioria dos *Avulavírus aviários tipo 1* (WELCH *et al.*, 2019).

**Figura 12.** (A) Diagrama esquemático do genoma do NDV; (B) Diagrama esquemático da estrutura do NDV.



Fonte: Mao *et al.* (2022).

O vírus da Doença de Newcastle pode ser classificado em três patótipo diferentes, compreendendo isolados lentogênicos, mesogênicos e velogênicos. Essa classificação é determinada com base na patogenicidade da cepa em galinhas, através de testes como o Tempo médio de morte em ovos embrionados (TMME), Índice de patogenicidade intravenosa em galinhas com idade igual a seis semanas ou Índice de patogenicidade intracerebral (IPIC), considerado como a avaliação definitiva de virulência (WOAH, 2021; SOUZA *et al.*, 2018). O advento da biologia molecular permite que a determinação da patogenicidade seja realizada de forma mais rápida através das técnicas de RT-qPCR e sequenciamento genético (WOAH, 2021; FLORES, 2017).

O NDV possui uma ampla gama de hospedeiros, podendo causar infecções em mais de 250 espécies de aves. As aves silvestres aquáticas e limícolas compreendem os principais hospedeiros e reservatórios naturais. Essas aves abrigam cepas lentogênicas do vírus de forma assintomática, eliminando partículas virais no ambiente, principalmente através de excrementos fecais, possibilitando a contaminação de aves domésticas e outras espécies silvestres (HIRSCHINGER *et al.*, 2021; BROWN; BEVINS, 2017).

O curso da infecção e os sinais clínicos em aves variam de acordo com a espécie afetada e a virulência do isolado. As variantes lentogênicas são pouco virulentas, geralmente causam infecções assintomáticas ou produzem sinais clínicos entéricos e respiratórios brandos. Essas variantes são comumente utilizadas na formulação de vacinas. As cepas mesogênicas apresentam virulência intermediária, provocando manifestações clínicas de doença respiratória e/ou entérica, associadas a taxas de mortalidade moderada. A forma mais severa da doença é causada pelas cepas velogênicas, estas são divididas em dois tipos: velogênicas viscerotrópicas, que acometem principalmente o sistema gastrointestinal e respiratório, e cepas velogênicas neurotrópicas, que desencadeiam infecções graves com manifestações clínicas no sistema respiratório e neurológico. Ambos os isolados de NDV velogênicos produzem sinais clínicos graves, frequentemente associados a elevadas taxas de mortalidade, que podem chegar a 100% (ZHANG; DING; XU, 2023; SOUZA *et al.*, 2018)

#### 2.4.2 Hospedeiros

As aves silvestres aquáticas e limícolas, pertencentes às ordens Anseriformes e Charadriiformes, desempenham o papel de hospedeiras naturais e reservatórios das cepas lentogênicas do *Avulavírus aviário sorotipo 1* e demonstram uma certa resistência genética a cepas virulentas (HU *et al.*, 2022). No entanto, esse patógeno tem uma gama numerosa de hospedeiros, abrangendo diversas espécies, como galiformes, biguás e columbiformes. Suspeita-se que essas últimas possam participar do ciclo de transmissão viral, atuando como potenciais reservatórios (HIRSCHINGER *et al.*, 2022; PEREIRA *et al.*, 2022).

Segundo Flores (2017), algumas espécies de psitacídeos e outras aves que não sejam as hospedeiras naturais têm potencial de funcionarem como portadoras do AAVv 1, sendo capazes de eliminar cepas virulentas no ambiente.

Os Avulavírus aviários também podem causar infecções em hospedeiros não aviários, incluindo humanos, macacos, coelhos, visons, hamster e suínos. Essas infecções já foram evidenciadas ocorrendo de forma natural e experimental, com algumas espécies manifestando sinais clínicos como alterações neurológicas em macacos e visons, e lesões gastrointestinais em suínos. Em humanos, a contaminação geralmente ocorre em trabalhadores de granjas avícolas, cursando com manifestação clínica de conjuntivite e, mais raramente, sintomatologia respiratória. Esses episódios destacam a preocupação com possíveis repercussões zoonóticas do NDV, ressaltando a importância da vigilância constante e controle desse patógeno (UL-RAHMAN *et al.*, 2021).

#### 2.4.3 Patogenia e Patogenicidade

O ciclo replicativo completo dos *Paramyxovírus aviários* tem duração de 14 a 30 horas. Contudo, cepas virulentas do NDV são capazes de completar o ciclo replicativo em aproximadamente 10 horas (FLORES, 2017). Esses vírus infectam as células-alvo através da ligação entre a proteína viral hemaglutinina-neuraminidase e os receptores de ácido siálico da célula hospedeira. Essa ligação possibilita a fusão entre o envelope viral e a membrana plasmática celular, mediada pela proteína precursora F0, após ser clivada em F1 e F2 pelas proteases celulares. Esse mecanismo permite a penetração do vírus e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular onde ocorre o desnudamento e iniciam-

se as etapas de transcrição e tradução do RNA viral mediadas pelo complexo LP. Essas etapas prosseguem até que haja acúmulo das proteínas virais no citoplasma das células infectadas. Em determinado momento, ocorre a interrupção na produção dos RNA mensageiros (mRNAs) individuais por mecanismos ainda desconhecidos, dando início á transcrição do genoma em toda sua extensão, com a produção de cópias de RNA (MAO *et al.*, 2022; FLORES, 2017).

A morfogênese viral tem início com a associação das proteínas N com o genoma, e posterior adição do complexo LP. As proteínas HN e F, que foram produzidas no retículo endoplasmático e modificadas no complexo de Golgi da célula infectada, são transportadas em vesículas trans-Golgi até a membrana plasmática, onde serão inseridas, compreendendo a segunda etapa da morfogênese. Simultaneamente, ocorre a clivagem da proteína F0 em F1 e F2, fator essencial para garantir a infectividade da progênie viral (FLORES, 2017).

De acordo com Flores (2017), as etapas posteriores da montagem das partículas virais são pouco conhecidas, mas acredita-se que ocorra o transporte de cópias da proteína M até a membrana plasmática. Neste estágio, essas cópias associam-se às glicoproteínas inseridas em um processo anterior. Ocorrendo em seguida interação entre os nucleocapsídeos com moléculas da proteína M. Finalmente, a HN realiza o desprendimento do vírion da membrana plasmáticas hospedeira e remove as moléculas de AS evitando autoagregação, resultando no egresso das progênies (FIGURA 6) (MAO *et al.*, 2022).



fenilalanina (F) na posição 117. A presença de vários aminoácidos básicos no sítio de clivagem permite que ocorra a clivagem viral por proteases encontradas em diversos tecidos. Essa característica favorece a ocorrência de infecções sistêmicas e extensa replicação viral. Diferentemente, nos vírus lentogênicos a clivagem ocorre apenas por proteases mediadas por tripsina e enzimas semelhantes, que estão presentes no sistema respiratório e intestinal, resultando em replicação viral restrita a esses sistemas (BUTT *et al.*, 2019; MAYERS; MANSFIELD. BROWN, 2017).

#### 2.4.4 Sinais clínicos

Os sinais clínicos variam de acordo com a patogenicidade da cepa infectante, espécie de ave acometida, idade e a presença de infecções secundárias. Cepas altamente virulentas podem desencadear quadros de morte súbita sem manifestações clínicas evidentes. Os sinais clínicos decorrentes de infecções pelo NDV são mais amplamente observados e descritos em galinhas, quando comparado a outras espécies aviárias (BAPTISTA *et al.*, 2021; FLORES, 2017).

As cepas lentogênicas geralmente causam infecções subclínicas ou cursam com sinais clínicos respiratórios e entéricos brandos. Quando presentes incluem tosse, espirros, respiração ofegante e ruídos respiratórios (ZHANG; DING; XU, 2023, BROWN; BEVINS, 2017).

Infecções causadas por isolados mesogênicos provocam sinais clínicos respiratórios, conjuntivite, diarreia, hemorragias intestinais, queda na produção de ovos e, em alguns casos, alterações neurológicas. Nesses casos, a taxa de mortalidade é moderada, exceto quando são observadas infecções bacterianas concomitantes, aumentando consideravelmente essa (BROWN; BEVINS, 2017)

As cepas velogênicas são responsáveis por causar sinais clínicos graves ou morte súbita resultando em taxas de mortalidade de até 100%. São divididas em viscerotrópicas velogênicas (VVNDV) e neurotrópicas velogênicas (VNNDV). As lesões decorrentes de infecções por isolados VVNDV ocorrem predominantemente nos sistemas gastrointestinal e respiratório. As principais manifestações clínicas incluem hemorragias agudas em todo o SGI, tosse, espirros, corrimento nasal, hiperemia conjuntival e conjuntivite. Além disso, apatia, inapetência, queda na postura e anomalias nos ovos geralmente estão

presentes. Os isolados VNNDV causam lesões nos sistemas respiratório e nervoso, com ausência de lesões gastrointestinais. Os sinais clínicos incluem espirros, corrimento nasal, ruídos de origem pulmonar e alterações neurológicas caracterizadas por inchaço de cabeça e face, fraqueza, paresia ou paralisia das asas, tremores musculares, ataxia e torcicolo (BAPTISTA *et al.*, 2021; BROWN; BEVINS, 2017)

Humanos que desenvolvem sinais clínicos decorrente de infecção por avulavírus aviários geralmente apresentam conjuntivite e sintomas análogos à gripe, como, febre, dor de cabeça e mal-estar (BROWN; BEVINS, 2017).

#### 2.4.5 Transmissão

As principais formas de transmissão ocorrem pelo contato direto entre as aves, através da inalação ou ingestão de partículas virais. A via fecal-oral compreende a principal forma de transmissão no ciclo silvestre-doméstico, onde a contaminação se dá pela ingestão de partículas virais presentes no solo, água, ou alimentos contendo excrementos fecais de aves infectadas (BROWN; BEVINS, 2017).

O período de incubação normalmente leva de 02 a 15 dias após exposição, enquanto o período de transmissão varia de acordo com a espécie de ave infectada. As aves galináceas (galinhas perus, perdizes e faisões) são capazes de transmitir o vírus durante 01 a 02 semanas pós infecção. Por outro lado, psitacídeos como papagaios, periquitos e araras, podem eliminar o NDV através de secreções respiratórias e fezes durante vários meses a 01 ano após a infecção (BROWN; BEVINS, 2017).

Infecções por AAvV-1 já foram comprovadas ocorrendo naturalmente ou através de estudos experimentais em 27 ordens taxonómicas, abrangendo mais de 236 espécies diferentes de aves. Contudo, acredita-se que todas as espécies de aves sejam suscetíveis à infecção (HICKS *et al.*, 2019; FLORES, 2017). A transmissão viral da avifauna silvestre para aves galináceas geralmente não produz consequências epidemiológicas significativas, dado que, invariavelmente, essas cepas são avirulentas para aves domésticas. No entanto, oportunamente, múltiplas trocas virais entre aves de vida livre e galinhas podem cepas virulentas (HICKS *et al.*, 2019).

O NDV também pode permanecer infectante em carcaças de aves

infetadas, podendo resistir por vários meses na pele e medula óssea quando mantidas refrigeradas. Além disso, a transmissão de isolados virais de ovos para pintinhos incubados também já foram relatadas (BORWN; BEVINS, 2017).

Transmissões por via indireta também ocorrem eficientemente através de fômites, pessoas, equipamentos, insetos, roedores e outras pragas. Além disso, esterco e camas contaminadas representam uma fonte potencial de transmissão, uma vez que o NDV é relativamente estável no ambiente (FLORES, 2017).

#### 2.4.6 Diagnóstico

O isolamento viral é considerado o “padrão ouro” de diagnóstico. Podendo ser realizado através da inoculação do *Avulavírus aviário 1* em ovos embrionados de galinhas ou em cultura celular. Os materiais de eleição a serem utilizados são swabs de traqueais e/ou cloacais de aves vivas e macerados de órgãos (baços, pulmões, intestinos, fígado, rins, coração e cérebro) de animais mortos (FLORES, 2017). Após processamento, esse material deve ser inoculado em ovos de galinhas SPF com 09 a 10 dias de idade. Decorridos 05 a 07 dias de incubação, o líquido alantoide é colhido e testado pelo método de hemaglutinação com eritrócitos de galinha. As amostras que demonstrarem hemaglutinação são testadas com antissoro específico pela técnica de HI, que permite diferenciar a presença do vírus da Doença de Newcastle de AIV e outros agentes aglutinantes. Contudo, não é possível a diferenciação entre cepas virulentas e avirulentas (MAO *et al.*, 2022; BELLO, 2018).

#### Testes sorológicos

Ensaio sorológicos são comumente utilizados como primeira linha de diagnóstico, existindo um grande número de testes disponíveis. O teste de inibição da hemaglutinação (HI) e o ensaio imunoenzimático (ELIZA) geralmente são utilizados para avaliar a presença de anticorpos específicos contra o NDV em aves suspeitas. No entanto, com essas técnicas não é possível a diferenciação entre anticorpos provenientes da exposição de campo e estirpes vacinais (FLORES, 2017).

## Diagnóstico molecular

Os métodos de RT-qPCR tem sido amplamente empregados em suspeitas de surtos, visto que viabilizam a obtenção do diagnóstico em poucas horas e permitem a análise de um grande número de amostra de uma só vez. Com alta especificidade e sensibilidade, esse método tem ganhado cada vez mais destaque, especialmente considerando que o custo de aquisição de ovos SPF e pintinhos de um dia tem se tornado pouco atraentes (BROWN; BEVINS, 2017). Para triagem de amostras, comumente são utilizados ensaios de qPCR direcionados para detecção do gene da matriz viral, pois essa proteína estrutural apresenta natureza altamente conservada nos NDV. Através de técnicas moleculares, também é possível fazer a determinação da virulência, a partir do sequenciamento do gene da proteína F. Outra aplicação importante da qPCR é a possibilidade de quantificar a carga viral em diferentes amostras (BELLO *et al.*, 2018).

## Determinação da patogenicidade

A determinação da patogenicidade das cepas isoladas é crucial para o completo diagnóstico de infecções causadas por *Avulavírus aviários 1*. Em ensaios *in vivo*, pode-se utilizar MDT (tempo médio de morte) que envolve a inoculação de amostras suspeitas em ovos embrionados, avaliado o tempo decorrido em horas necessário para matar embriões de galinhas. Outro método comumente utilizado é o IPIC (índice de patogenicidade intracerebral), determinado pela junção de pontos baseados nos sinais clínicos apresentados por pintinhos de um dia após a inoculação intracerebral ou intravenosa de amostras positivas, com avaliações a cada 24 horas, durante 08 dias. Os graus de observação para pontuação são: 0 = ave normal, 1 = ave doente e 2 = ave morta; cepas lentogênicas apresentam resultados iguais ou próximos de 0, mesogênicas e velogênicas apresentam IPIC superiores a 0,7, cepas altamente virulentas demonstram IPIC no valor máximo de 2,0 (WOAH, 2021; BROWN; BEVINS, 2017).

### 2.4.7 Cenário atual da doença de Newcastle no Brasil

A doença de Newcastle é considerada exótica no Brasil e atualmente é

considerada erradicada da avicultura industrial. Após as últimas detecções da circulação do NDV que ocorreram predominantemente em aves de subsistência no ano de 2006, foi instituído pelo MAPA o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), que tem garantido que a avicultura industrial permaneça livre desse patógeno (RODRIGUES *et al.*, 2022).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Material biológico**

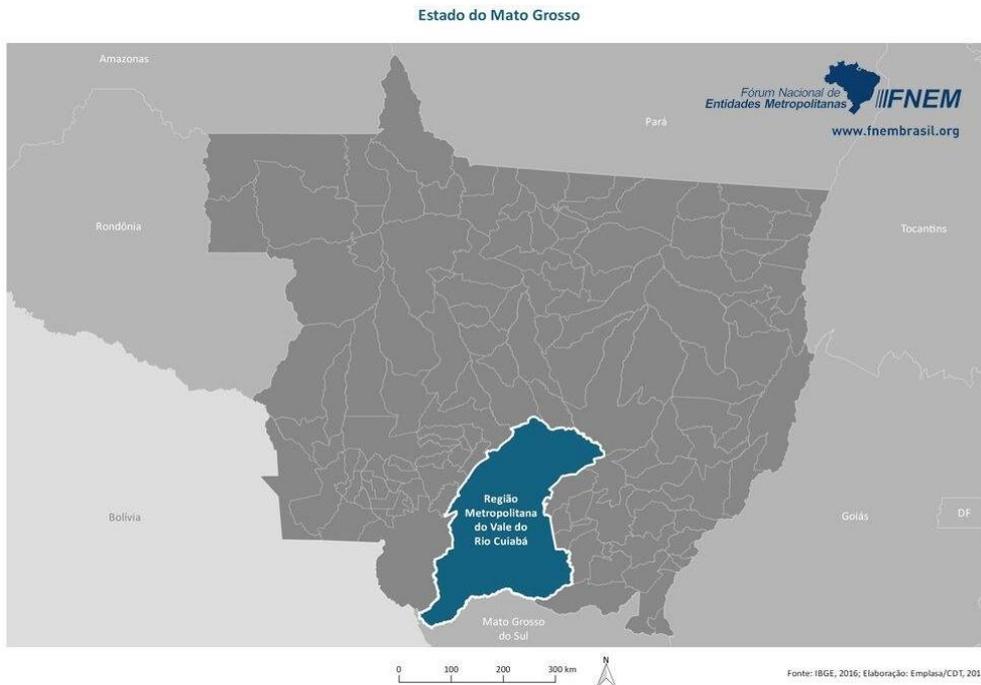
As amostras biológicas utilizadas na pesquisa foram provenientes de coletas realizadas para o projeto “Monitoramento de SARS-COV-2, Coronavírus e vírus da Influenza no Pantanal”, autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o protocolo de número: 23108.085496/2020-32.

Todas as áreas de amostragem foram orientadas pela equipe de ornitólogos visando a ampla variedade populacional de aves residentes, locais com fluxo de aves migratórias, assim como a proximidade das regiões com centros urbanos.

As coletas de amostras foram conduzidas em 17 campanhas que abrangeram cinco municípios do estado de Mato Grosso: Cuiabá, Barão de Melgaço, Nobres, Poconé e Santo Antônio do Leverger (Figuras 14 e 15), durante um período de três anos (2021-2023). Dentro do município de Barão de Melgaço, três microrregiões foram selecionadas como pontos estratégicos para captura de aves aquáticas: Baía do Chacororé, Baía Siá Mariana e Baía São João.

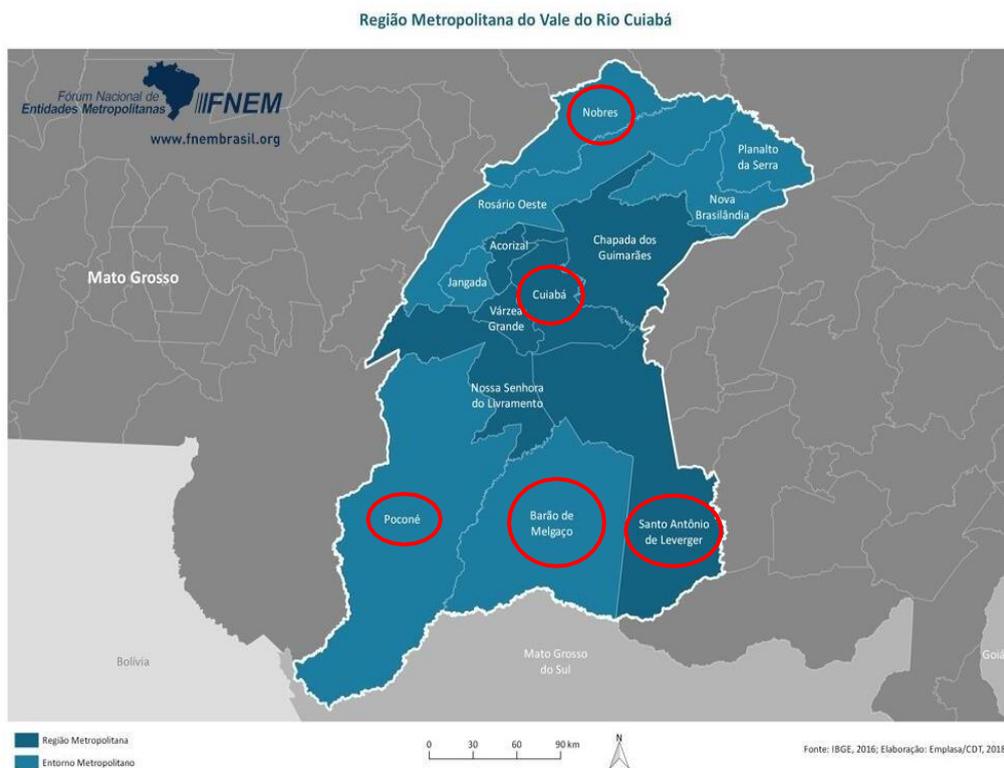
As capturas das aves foram executadas com redes de neblina em locais de mata fechada, mantidas abertas por um período de três a cinco dias em cada ponto de coleta. Adicionalmente, foram utilizados passaguás para captura das aves aquáticas nas regiões de baía ou em localidades onde estivessem presentes (Figura 16).

**Figura 14.** Localização da região Metropolitana do Vale do Rio Cuiabá, estado de Mato Grosso Brasil.



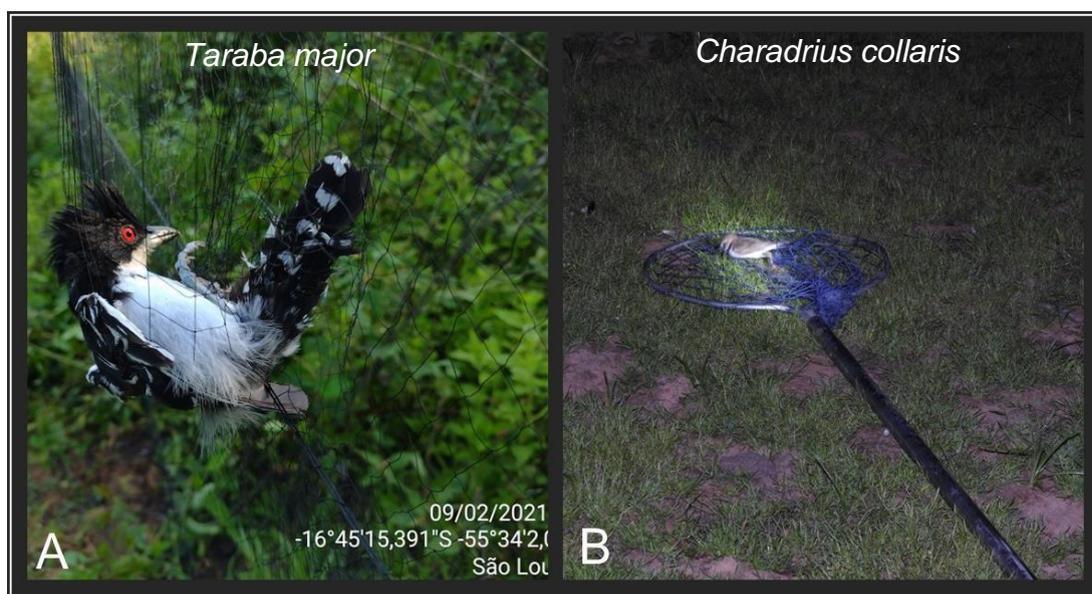
Fonte: IBGE (2016).

**Figura 15.** Municípios do estado de Mato Grosso, Brasil, onde foram realizadas as coletas de amostras nos anos de 2021-2023.



Fonte: IBGE (2016).

**Figura 16.** Aves capturadas através do método de rede de neblina (A) e passaguá (B).



Fonte: Elaine R. Bueno. Laboratório de Ecologia de Aves UFMT (2022).

As amostras de interesse para pesquisa consistiram em swabs que foram coletados das regiões orotraqueais e cloacais. Essas amostras foram acondicionadas em microtubos contendo meio de transporte viral e preservadas em barris de nitrogênio líquido. Após a obtenção do material biológico, cada espécime foi identificado taxonomicamente, de acordo com a ordem, família, nome científico e popular. Posteriormente, as aves foram catalogadas para facilitar a classificação conforme seu nicho ecológico, levando em consideração a relação com o ambiente, hábitos, padrão de movimentação e dieta alimentar (Figura 17). Ao final de todo o procedimento, as aves eram soltas novamente em seu habitat.

Ao encerramento de cada campanha, todo o material obtido foi armazenado no ultrafreezer a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , localizado no Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso, campus Cuiabá, até o início do processamento molecular.

**Figura 17.** Coleta de materiais (swabs mistos) e catalogação das espécies.



Fonte: Elaine R. Bueno. Laboratório de Ecologia de Aves UFMT (2022).

### 3.2 Análise molecular

As 1.138 amostras de swabs mistos (coletados das regiões orotraqueais e cloacais) dos espécimes capturados, foram submetidas a análise molecular no Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (FAVET-UFMT), campus Cuiabá. As amostras que testaram positivas foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa em vírus emergentes, no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

As extrações dos materiais genéticos foram realizadas com o kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante para amostras de fluidos. Compreendendo um volume de 300µL de cada amostra, previamente armazenada em meio de transporte viral (VTM) a temperatura de -80°C.

Para a detecção dos agentes foram realizados ensaios TaqMan™ RT-qPCR (Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase) com

o kit AgPath-ID™ One-step RT-PCR (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific), conforme orientação da Rede Nacional de Vigilância de Vírus em Animais Silvestres PREVIR – MCTI (Projeto Rede de Vigilância de Vírus – Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação).

#### Detecção molecular do vírus influenza A

Para o ensaio TaqMan (RT-qPCR) do vírus Influenza A, foram utilizados um conjunto de iniciadores específicos para o gene da matriz (M) e uma sonda de hidrólise projetada para uma região conservada em todos os genes da matriz dos vírus influenza tipo A seguindo o proposto por Spackman *et al.* (2002). Os iniciadores e a sonda de hidrólise são compostos pelas sequências de nucleotídeos detalhadas a seguir:

Iniciador senso (forward): AIV M+25 (5'-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3')

Iniciador antisenso (Reverse): AIV M-124 (5'-CCTGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTGCGC-3')

Sonda de hidrólise (probe): AIV M+64 (5'-FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ-1-3')

A amplificação do DNA para o vírus *Influenza A* foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 4 µL de molde de RNA, 5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de tampão 2X RT-PCR, 1 µL mistura de Enzimas 25X RT-PCR, 1 µL de primer forward (20 pmol/µL), 1 µL de primer reverse (20 pmol/µL) e 1 µL de sonda (6 pmol/µL) (AgPath-ID™ One Step RT-PCR Reagents). O protocolo de amplificação iniciou-se com transcrição reversa a 45°C por 10 minutos, desnaturação primária a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 52° por 30 segundos e extensão a 72° por 10 segundos. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores de PCR em tempo real (QuantStudio 1 e 3), assim como a análise dos dados.

A amostra amplificada para o vírus influenza tipo A na TaqMan RT-qPCR foi submetida a um segundo protocolo de amplificação por RT-PCR convencional de acordo com o protocolo descrito por Zhou *et al.* (2009) e Hoffman *et al.* (2001). Foram utilizados os iniciadores direcionados para as 12 (MBT-uni12 (5-ACGCGTGATCAGCA AAAGCAGG) ou 13 bases (5-ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG) conservadas nas extremidades de cada

segmento de RNA de todos os vírus influenza A. Utilizou-se o kit de detecção *SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* para amplificação de todos os 08 segmentos do vírus influenza A (HOFFMAN *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2009).

Foi realizado o sequenciamento genético dos segmentos por meio do dispositivo NGS MinION (Oxford Nanopore Technologies), baseado nos protocolos propostos por Quick (2020) e por Pater *et al.* (2021) com adaptações.

#### Detecção molecular do vírus da doença de Newcastle

Para detecção do Avulavírus aviário sorotipo 1 foram realizados ensaios TaqMan utilizando iniciadores e sonda projetados para detectar sequências de uma região conservada do gene da proteína M (matriz), de acordo com o proposto por Wise *et al.* (2004). As sequências de nucleotídeos dos iniciadores e sonda utilizados foram:

Iniciador senso (forward): M+4100 (5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3')

Iniciador antisenso (reverse): M-4220 (5'-CCTGAGGAGAGGCAATTTGCTA-3')

Sonda (probe): M+4169 (5'-FAM-TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC – TAMRA 3')

A reação de amplificação para AAVv 1 continha um volume final de 25 µL, contendo 8 µL de molde de RNA, 2 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Tampão 2X RT-PCR, 1 µL Mistura de Enzimas 25X RT-PCR, 0,5 µL de primer forward (20 pmol/µL), 0,5 µL de primer reverse (20 pmol/ µL) e 05 µL de sonda (6 pmol/ µL). O protocolo de amplificação iniciou-se com transcrição reversa a 45°C por 10 minutos, desnaturação primária a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 10 seg. As reações foram realizadas nos termocicladores para PCR em tempo real QuantStudio 1 e 3, assim como a análise dos dados.

## 4 RESULTADOS

Foram identificadas taxonomicamente 18 ordens e 162 espécies do total de 1.138 aves silvestres capturadas, das quais foi possível realizar a coleta de swabs mistos. A partir desses dados de identificação, procedeu-se a classificação do status de ocorrência no Brasil, conforme descrito por Pacheco

*et al.* (2021). Alcançou-se um total de 916 aves residentes/migratórias com evidências reprodutivas no país. Aves enquadradas nessa categoria realizam movimentos migratórios dentro do território nacional. Sessenta e seis indivíduos foram identificados como visitantes não reprodutivos oriundos do Norte (VI (N)), região Neártica, Caribe ou extremo norte da América do Sul, seis (6) como visitantes não reprodutivos oriundos de áreas a oeste do território brasileiro (VI (W)) e apenas uma (1) ave visitante não reprodutiva oriunda de áreas ao sul do Brasil (VI(S)), como Uruguai ou Chile (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação taxonômica em ordem das 1.138 aves silvestres amostradas nos anos de 2021 – 2023 e padrão de ocorrência no Brasil de acordo com Pacheco *et al.* (2021).

Ordem	Nº de indivíduos	Status de ocorrência no Brasil			
		Residente/Migratória <sup>BR</sup>	VI (N)	VI (W)	VI (S)
Accipitriformes	11	9	2	-	-
Anseriformes	151	151	-	-	-
Caprimulgiformes	6	8	-	-	-
Ciconiiformes	2	2	-	-	-
Charadriiformes	248	111	64	-	-
Columbiformes	90	80	-	-	-
Coraciiformes	8	8	-	-	-
Cuculiformes	5	5	-	-	-
Eurypygiformes	1	1	-	-	-
Galbuliformes	9	9	-	-	-
Gruiformes	4	4	-	-	-
Passeriformes	575	502	-	6	1
Pelecaniformes	7	7	-	-	-
Piciformes	13	12	-	-	-
Psittaciformes	3	2	-	-	-
Strigiformes	2	2	-	-	-
Suliformes	1	1	-	-	-
Trogoniformes	2	2	-	-	-
<b>Total</b>	<b>1.138</b>	<b>916</b>	<b>66</b>	<b>6</b>	<b>1</b>

**BR:** Residente ou migrante reprodutivo (com evidências de reprodução no país disponível).

**VI (N):** Visitante sazonal não reprodutivo, oriundo do Norte (Região Neártica, Caribe ou extremo norte da América do Sul).

**VI (W):** Áreas a oeste do território brasileiro (Peru, Bolívia; Paraguai e Argentina (sudoeste)).

**VI (S):** Áreas ao sul do território brasileiro (Uruguai e Chile)

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Ao total, foram capturadas 73 aves migratórias intercontinentais. Dessas, 64 pertenciam à ordem Charadriiformes, 07 Passeriformes, e apenas 02 da ordem Accipitriformes. De acordo com os dados de registros ornitológicos brasileiros, 68 das 73 espécies de aves migratórias possuem registro de ocorrência em todos os biomas brasileiros, podendo ser encontrados em praticamente todos os estados do País (Tabela 3) (WikiAves – A Enciclopédia de Aves do Brasil).

Tabela 3. Aves migratórias intercontinentais e registro de ocorrência no Brasil.

Ordem	Espécie	Número de indivíduos	Rotas migratórias	Registro de ocorrência no Brasil
Charadriiformes	<i>Actitis macularius</i> <sup>1</sup>	1	Oceano Atlântico; Amazônia central/Pantanal	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Calidris fuscicollis</i> <sup>1</sup>	5	Oceano Atlântico	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Calidris melanotos</i> <sup>1</sup>	24	Oceano Atlântico/Mississipi	Todos os biomas
Passeriformes	<i>Elaenia chilensis</i> <sup>3</sup>	1	Oceano Atlântico/Encosta leste dos Andes	Todos os biomas
Passeriformes	<i>Inezia inornata</i> <sup>2</sup>	5	Rota migratória não definida*	Amazônia, Cerrado, Pampa, Pantanal
Accipitriformes	<i>Pandion haliaetus</i> <sup>1</sup>	2	Oceano Atlântico/Amazônia central	Todos os biomas
Passeriformes	<i>Serpophaga subcristata</i> <sup>2</sup>	1	Rota migratória não definida**	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Tringa flavipes</i> <sup>1</sup>	13	Oceano Atlântico	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Tringa melanoleuca</i> <sup>1</sup>	3	Oceano Atlântico; Amazônia central/Pantanal	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Tringa solitaria</i> <sup>1</sup>	18	Oceano Atlântico/Mississipi	Todos os biomas

<sup>1</sup>VI (N): Visitante sazonal não reprodutivo, oriundo do Norte (Região Neártica, Caribe ou extremo norte da América do Sul).

<sup>2</sup>VI (W): Áreas a oeste do território brasileiro (Peru, Bolívia; Paraguai e Argentina (sudoeste).

<sup>3</sup>VI (S): Áreas ao sul do território brasileiro (Uruguai e Chile)

Fonte: Elaborada pela autora, de acordo com informações obtidas em: \*Somenzari et al. (2018); Serrano (2010); \*\* Nunes e Tomas (2008) e Wiki Aves.

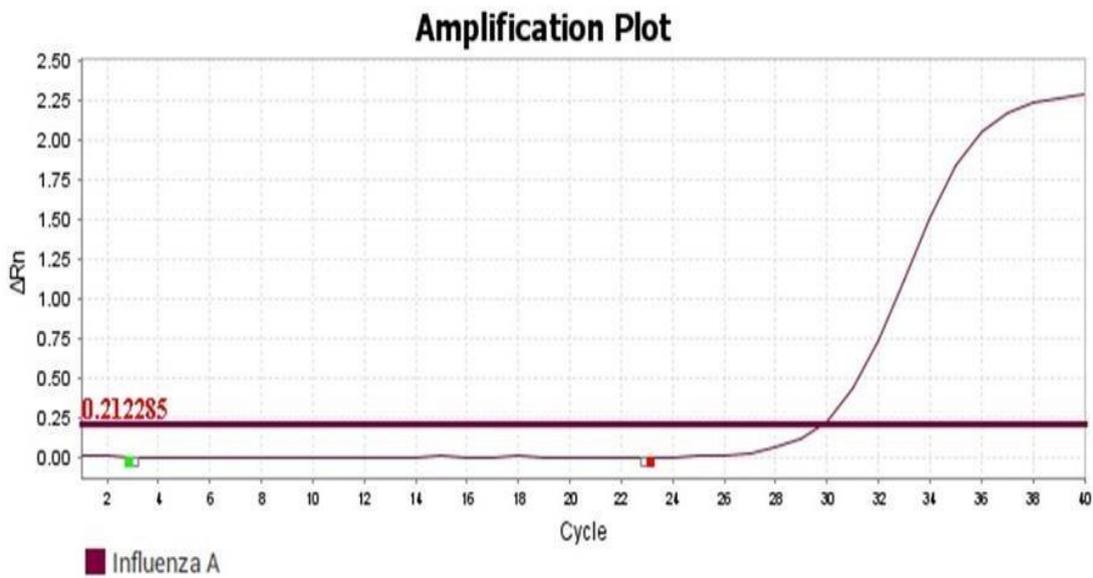
Todas as 1.138 amostras de swabs mistos avaliadas por ensaios TaqMan RT – qPCR foram negativas para o vírus da doença de Newcastle, e 1.137 amostras também apresentaram resultado negativo para o vírus influenza A. Obteve-se resultado positivo para *Alphainfluenzavirus* em uma amostra

proveniente de uma ave limícola da ordem Charadriiformes, espécie *Charadrius collaris* e popularmente conhecida como batuíra-de-coleira (amostra MT 1403). Durante a triagem para identificação do espécime, foi possível obter alguns dados, como peso (29 gramas), idade (adulto), e o sexo não pode ser definido devido à espécie não apresentar dimorfismo sexual na plumagem. A ave também não apresentava sinal clínico no momento da coleta. A captura dessa ave foi realizada pelo método de busca ativa no dia 24 de agosto de 2023, na Baía de Chacororé, localizada no município de Barão de Melgaço (MT).

A reação foi realizada em material extraído a partir de swab misto e apresentou Ct (*Cycle threshold*) no valor de 30 (Figura 18). De acordo com Spackman (2020), amostras com pico de amplificação menor que 40 devem ser consideradas positivas. Frente a esse resultado, optou-se por submeter amostras individuais de swab oral e cloacal dessa ave à extração de material genômico, como descrito anteriormente. Após a extração, ambas amostras foram submetidas a reação de RT-qPCR seguindo o mesmo protocolo utilizado para as amostras de swabs mistos. A partir do swab oral, a amplificação foi detectada no Ct de valor 26 (Figura 19). Já a amostra de swab cloacal apresentou aumento na curva de amplificação, mas que não alcançou o limiar do Ct (Figura 20).

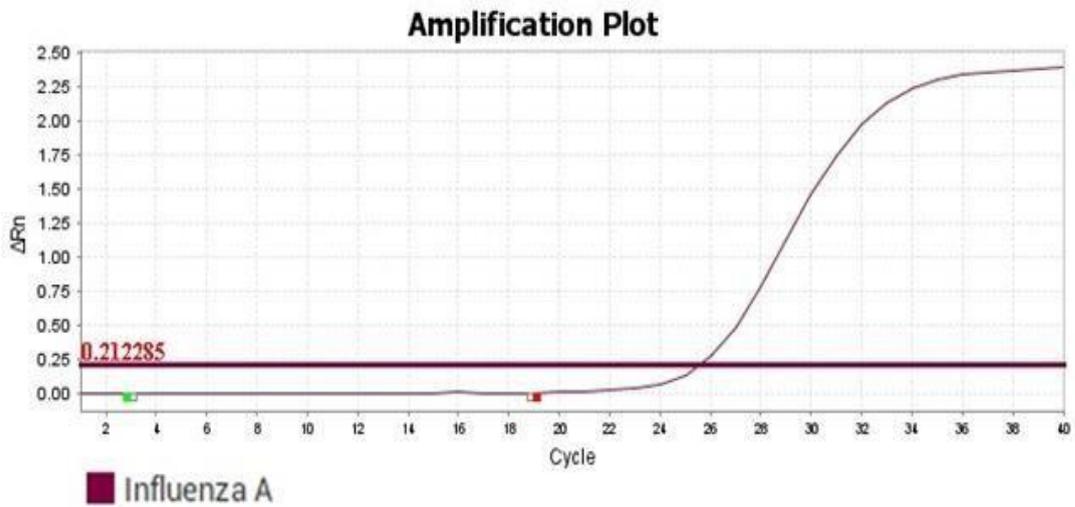
A amostra positiva foi submetida novamente a técnica de RT-qPCR em um segundo laboratório (ICB-UCP) seguindo o protocolo de amplificação descrito por Spackman *et al.* (2002), onde também testou positiva para vírus influenza A. Posteriormente, foi realizada uma amplificação multi-genômica de RT-PCR convencional, segundo Zhou *et al.* (2009), e a amostra apresentou amplificação de diferentes segmentos (Figura 19), muitos deles de peso molecular inespecífico. Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento genômico por meio da plataforma MinION-NSG, contudo, não foi possível a determinação genômica do *Alphainfluenzavirus* por este ensaio.

**Figura 18.** Curva de amplificação da amostra de swab misto para o vírus Influenza A, na técnica de RT-qPCR.



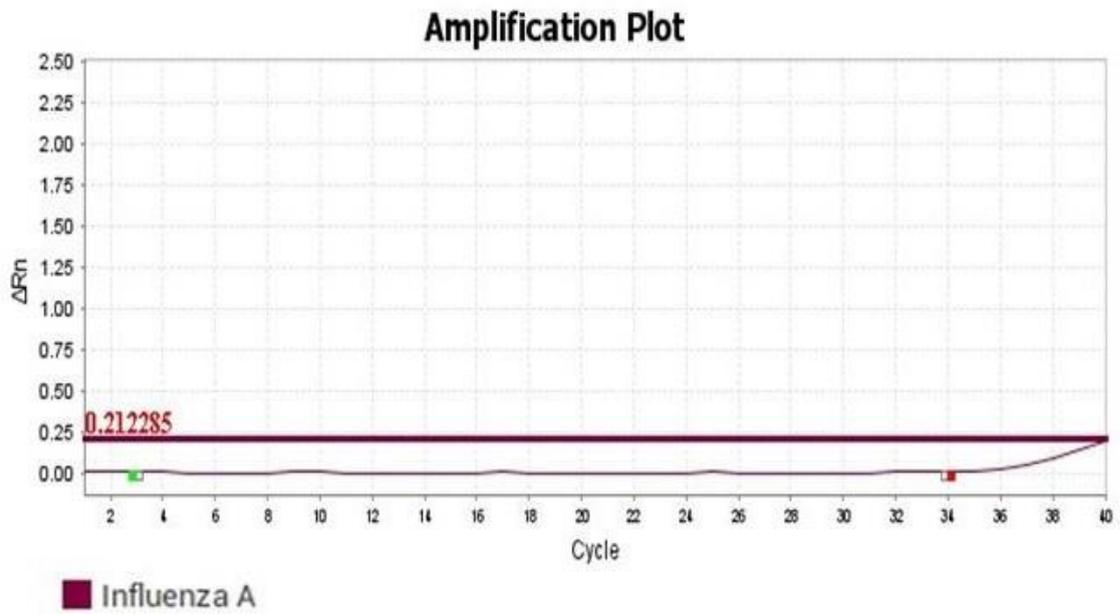
Fonte: Arquivo pessoal da autora (2023).

**Figura 19.** Curva de amplificação da amostra de swab oral para o vírus Influenza A, na técnica de RT-qPCR.



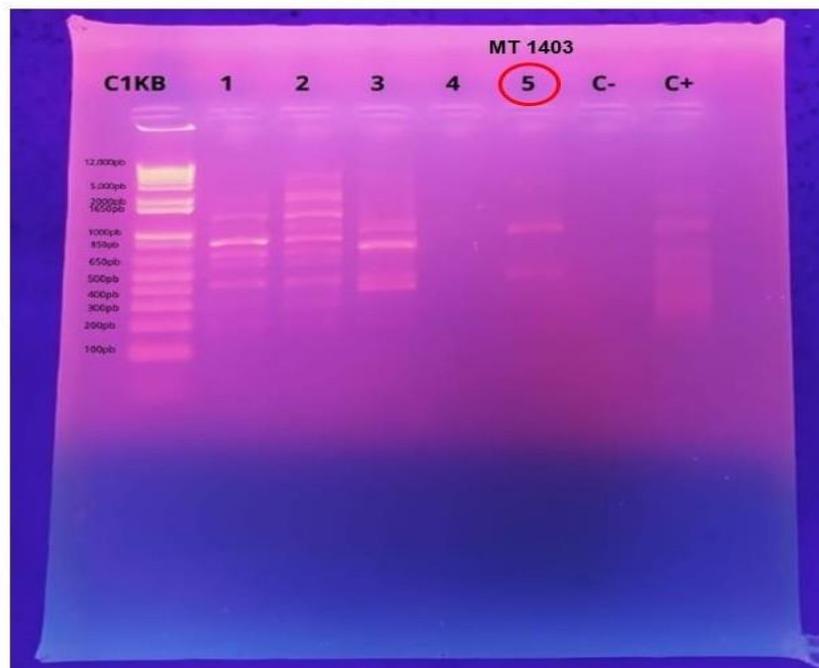
Fonte: Arquivo pessoal da autora (2023).

**Figura 20.** Curva de amplificação da amostra de swab cloacal para o vírus Influenza A, na técnica de RT-qPCR.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2023).

**Figura 21.** Eletroforese da amostra positiva na RT-qPCR para vírus influenza A (destacada em vermelho).



Fonte: Jansen de Araújo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/USP (2024).

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível capturar 73 aves migratórias no pantanal do estado de Mato Grosso. Embora corresponda a aproximadamente 6% (73/1.138) do total de aves capturadas, do ponto de vista epidemiológico, a presença desses espécimes em território brasileiro é significativamente importante, dado que as aves silvestres migratórias compreendem as principais transportadoras biológicas dos AIVs e NDVs em escala global, inclusive para regiões onde a circulação viral é incomum (BLAGODATSKI *et al.*, 2021; UL-RAHMAN *et al.*, 2021).

Dos 1.138 swabs mistos avaliados, todos apresentaram resultado negativo na técnica molecular de RT-qPCR para o vírus da doença de Newcastle. Este resultado está em conformidade com estudos realizados no Pantanal mato-grossense por Bourscheid *et al.* (2020) e por Pinto *et al.* (2016) em aves domésticas e aves silvestres, respectivamente, nos quais também não foram encontradas evidências da circulação do NDV pela técnica de RT-qPCR no estado de Mato Grosso.

Em relação ao vírus influenza A, do total de 1.138 amostras, uma (MT 1403) apresentou resultado positivo em amostras de swab misto (orotraqueal + cloacal) e swab oral pelo método *Taqman* de Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). A amostra de swab cloacal, por outro lado, não alcançou o limiar do Ct, e por isso, foi considerada não detectada. Este resultado sugere que no momento da captura desta ave a replicação viral ocorria apenas no sistema respiratório, com ausência ou eliminação não detectável de *Alphainfluenzavirus* por via fecal. Há pouco conhecimento sobre as taxas de replicação dos subtipos virais de AIV's em órgãos de aves silvestres. No entanto, é conhecido que a distribuição de receptores de ácido siálico (AS) varia consideravelmente entre as diferentes espécies, o que influencia diretamente o local preferencial de replicação viral e a taxa de eliminação do vírus, seja por via respiratória ou gastrointestinal (ZHAO; PU, 2022; CRIADO *et al.*, 2021). Corroborando com nosso trabalho, outros estudos também demonstram que em algumas espécies aviárias como galinhas (*Gallus gallus*), patos tufados (*Aythya fuligula*) e patos mergulhadores (*Mergus octosetaceus*), a replicação viral é principalmente observada no sistema respiratório superior, mostrando taxas de detecção superior em comparação com

a via fecal (NILSSON *et al.*, 2023; VAN DEN BRAND *et al.*, 2018). Além disso, de acordo com Kuchipudi *et al.* (2021) as aves da ordem Charadriiformes apresentam abundância de receptores AS  $\alpha$ 2,6-Galactose e AS  $\alpha$ 2,3-Galactose no epitélio do trato respiratório, o que justifica a detecção viral positiva de amostras da região orotraqueal nesse estudo.

A amplificação dos segmentos do genoma da reação *endpoint* PCR não produziu amplificação desejada para o sequenciamento genômico, por isso, não foi possível determinar o subtipo envolvido na detecção. Esses resultados divergentes podem ser atribuídos a três fatores ou nas suas combinações. Primeiro, a quantidade insuficiente de RNA viral presente na amostra para a amplificação dos segmentos genômicos, o que justifica sua detecção apenas pelo método de RT-qPCR, reconhecido por apresentar maior sensibilidade na detecção de baixos números de cópias de DNA/cDNA em comparação ao método convencional (CROVILLE *et al.*, 2018; ARTIKA *et al.*, 2022). Segundo, a degradação do RNA viral durante o transporte da amostra do estado de Mato Grosso para o estado de São Paulo, onde foram realizadas as técnicas de *endpoint* PCR e sequenciamento genético. Sabe-se que há maior suscetibilidade do ácido ribonucleico à degradação química e/ou física quando comparado ao ácido desoxirribonucleico. Considerando que a amostra foi transportada por um serviço de encomenda expressa e, embora tenha sido armazenada corretamente para o deslocamento, entende-se que ficou suscetível à variações de pH e temperatura. A alteração constante desses fatores influencia diretamente na degradação do material genético (BEGUM; JABEEN; RIZVI, 2023; CHHEDA *et al.*, 2023). Terceiro, a presença de sequências hospedeiras e bacterianas abundantes pode interferir na detecção do material genético-alvo quando este está em baixas quantidades na amostra submetida ao sequenciamento GNS (GORAICHUK *et al.*, 2024). Ainda em relação ao NGS, de acordo com IP *et al.* (2023), o dispositivo utilizado para o sequenciamento nessa pesquisa (Minlon da Oxford Nanopore Technology) produz maiores taxas de erros e menor sensibilidade quando comparados a outros sistemas de sequenciamento de nova geração.

A captura de aves migratórias da ordem Charadriiformes foi predominante (64/73), seguido de Passeriformes (7/73) e por último Acciptriformes (2/73). De acordo com os registros ornitológicos essas espécies identificadas podem ser

encontradas em todos os biomas brasileiros, o que aumenta significativamente a chance de dispersão viral entre diferentes regiões do país (Pacheco *et al.*, 2021; Wiki Aves). De acordo com o MAPA (2023) já somam um total de 148 surtos de HPAI (H5N1) notificados no Brasil, onde as infecções predominam nas espécies aquáticas limícolas Trinta-réis-de-bando (*Thalasseus acuflavidus*) e Trinta-réis-real (*Thalasseus maximus*), também pertencentes à ordem Charadriiformes.

O material biológico de onde detectou-se a presença do vírus influenza A pertence a uma ave residente limícola da espécie *Charadrius collaris*, capturada na Baía do Chacororé um dos maiores corpos hídricos (lagoas) do Pantanal matogrossense, localizado no município de Barão de Melgaço. As baías que compõe a planície inundável do Pantanal são importantes regiões de escala para aves migratórias, e a obtenção desse resultado confirma o que já levantado por Araujo *et al.* (2018) e BOURSCHEID *et al.* (2020) sobre a extrema importância no estudo de patógenos virais em regiões próximas a grandes planícies alagadas.

As aves residentes/migratórias (nacionais ou regionais) compreenderam o maior número de indivíduos capturados, predominando aves pertencentes a ordem Passeriformes (502/916). Apesar dessas aves não estarem diretamente relacionadas com a propagação dos vírus HPAI e o Vírus da Doença de Newcastle, o monitoramento de campo nessas populações se faz tão importante quanto a avaliação das aves com hábitos migratórios, levando em consideração que a principal via de transmissão de ambos agentes é a fecal-oral, e a contaminação ambiental com excrementos fecais de espécimes aquáticos é um potencial risco de contaminação para as aves residentes, principalmente as que habitam regiões próximas a rios e corpos d'água. Vale ressaltar que esses vírus são capazes de resistir por um período prolongado em áreas úmidas e matéria orgânica (RAHMAN; HABIB; SHABBIR, 2018; BLAGODATSKI *et al.*, 2021).

A detecção do vírus Influenza A na espécie residente *Charadrius collaris* nesse estudo ressalta a importância da realização de ensaios epidemiológicos no Pantanal mato-grossense e destaca a necessidade de uma compreensão mais aprofundada sobre o comportamento e ecologia da avifauna nacional. É essencial direcionar mais pesquisas para entender como esta espécie e outras aves residentes contribuem com a circulação de vírus influenza A no estado de Mato Grosso, bem como o nível de interação delas com a fauna doméstica e a

espécie humana, especialmente frente à epidemia global de HPAI (H5N1) enfrentada no momento.

## 6 CONCLUSÃO

Conclui-se no presente estudo que não há atividade do vírus da doença de Newcastle nas aves silvestres da região do pantanal mato-grossense e entorno. A detecção de um vírus Influenza A por meio do método de RT-qPCR em uma ave residente da espécie *Charadrius collaris* no estado de Mato Grosso é um achado significativo e inusitado que destaca a importância de investigações epidemiológicas nas regiões de Baías do Pantanal mato-grossense. Ainda há muitas lacunas a serem preenchidas quanto ao papel específico dessa espécie na circulação viral nessas áreas.

É crucial direcionar novos estudos para mais investigações de patógenos virais emergentes e reemergentes na avifauna nacional. Essas pesquisas são essenciais para avaliar o risco epidemiológico nas interfaces de transbordamento entre a vida selvagem, pecuária e humana. Ao entendermos mais sobre a ecologia e o comportamento das aves, bem como sobre a dinâmica da transmissão viral, é possível desenvolver estratégias mais eficazes para a prevenção e o controle de doenças infecciosas que possam afetar tanto a saúde animal quanto a saúde pública.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDELWHAB, E. M.; METTENLEITER, T. C. Zoonotic Animal Influenza Virus and Potential Mixing Vessel Hosts. **Viruses**, [S.L], v. 15, n. 4, p. 980, 16 abr. 2023. DOI: 10.3390/v15040980

ABUBAKAR, U.; AMRANI, L.; KAMARULZAMAN, F. A.; KARSANI, S. A.; HASSANDARVISH, P.; KHAIRAT, J. E. Avian Influenza Virus Tropism in Humans. **Viruses**, [S.L], v. 15, n. 4, p. 833, 24 mar. 2023. DOI: 10.3390/v15040833

AFANADOR-VILLAMIZAR, A.; GOMEZ-ROMERO, C.; DIAZ, A.; RUIZ-SAENZ, J. Avian influenza in Latin America: A systematic review of serological and molecular studies from 2000-2015. **PLoS One**, [S.L], v. 12, n. 6, p. e0179573, 20 jun. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0179573

AHMAD, F. *et al.* Avian influenza spillover to humans: Are we prepared to deal with another potential pandemic? **Travel Medicine and Infectious Disease**, [S.L], v. 55, p. 102634, 01 set. 2023. ScienceDirect. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2023.102634>. Acesso em: 12 de set. 2023.

AKIN, L.; GÖZEL, M. G. Understanding dynamics of pandemics. **TURKISH JOURNAL OF MEDICAL SCIENCES**, [S.L], v. 50, n. 3, p. 515–519, 21 abr. 2020. DOI: 10.3906/sag-2004-133

ARAÚJO, A. C. *et al.* Incursion of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus, Brazil, 2023. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L], v. 30, n. 3, p. 619–621, 01 mar. 2024. DOI: 10.3201/eid3003.231157

ARAÚJO, J. *et al.* Migratory birds in southern Brazil are a source of multiple avian influenza virus subtypes. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, [S.L], v. 12, n. 2, p. 220–231, 15 dez. 2018. DOI: 10.1111/irv.12519

ARTIKA, I. M.; DEWI, Y. P.; NAINGGOLAN, I. M.; SIREGAR, J. E.; ANTONJAYA, U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. **Genes**, [S.L], v. 13, n. 12, p. 2387, 16 dez. 2022. DOI: 10.3390/genes13122387

BAPTISTA, F. M. F. Newcastle em Aves de Produção: Revisão de Literatura. **Almanaque de Ciências Agrárias**, [S.L], v. 04, n. 01, p. 1-8, 2021. Disponível em: <https://revistaaca.unifio.edu.br/index.php/ACA/article/view/47>

BARBIERI, E.; ESPARZA, K. A. Á. Migrant birds present on Ilha Comprida, southern coast of the State of São Paulo. **Ocean and Coastal Research**, [S.L], v. 71, n. suppl 1, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/2675-2824071.22030eb>. Acesso em: 26 dez. 2023.

BEERENS, N.; HEUTINK, R.; HARDERS, F.; BOSSERS, A.; KOCH, G.; PEETERS, B. Emergence and Selection of a Highly Pathogenic Avian Influenza H7N3 Virus. **Journal of Virology**, [S.L], v. 94, n. 8, p. e01818-19, 22 jan. 2020. DOI: 10.1128/JVI.01818-19

BEGUM, S.; JABEEN, S.; RIZVI, S. A. H. The pattern of RNA integrity and the expression of housekeeping genes are influenced by sodium hypochlorite and ascorbic acid. **American Journal of Stem Cells**, v. 12, n. 1, p. 12–22, 25 fev. 2023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10018005/>. Acesso em: 11 set. 2023.

BELLO, M. B.; YUSOFF, K.; IDERIS, A.; HAIR-BEJO, M.; PEETERS, B. P. H.; OMAR, A. R. Diagnostic and Vaccination Approaches for Newcastle Disease Virus in Poultry: The Current and Emerging Perspectives. **BioMed Research International**, [S.L], v. 2018, p. 1–18, 5 ago. 2018. DOI: 10.1155/2018/7278459

BLAGODATSKI, A. *et al.* Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. **Pathogens**, [S.L], v. 10, n. 5, p. 630, 01 mai. 2021. DOI: 10.3390/pathogens10050630

BODEWES, R.; KUIKEN, T. Changing Role of Wild Birds in the Epidemiology of Avian Influenza A Viruses. **Advances in Virus Research**, [S.L], v. 100, p. 279–307, 2018. Acesso em: 15 dez. 2020.

BORAU, M. S.; STERTZ, S. Entry of influenza A virus into host cells — recent progress and remaining challenges. **Current Opinion in Virology**, [S.L], v. 48, p. 23–29, nov. 2021. DOI: 10.1016/bs.aivir.2017.10.007

BOURSCHEID, C. L. P. R. *et al.* Surveillance of avian influenza and Newcastle disease viruses in backyard poultry raised near migratory bird sites in Mato Grosso state, Brazil. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, [S.L], v. 39, n. 3, p. 907–922, 01 dez. 2020. DOI: 10.20506/rst.39.3.3187

BROWN, V. R.; BEVINS, S. N. A review of virulent Newcastle disease viruses in the United States and the role of wild birds in viral persistence and spread. **Veterinary Research**, [S.L], v. 48, n. 68, p. 1-15, 26 out. 2017. DOI: 10.1186/s13567-017-0475-9

BRUNO, A. *et al.* First case of human infection with highly pathogenic H5 avian Influenza A virus in South America: A new zoonotic pandemic threat for 2023. **Journal of Travel Medicine**, [S.L], v. 30, n. 5, p. 1-3, 05 abr. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jtm/taad032>. Acesso em: 02 de jul. 2023.

BURMAN, B.; PESCI, G.; ZAMARIN, D. Newcastle Disease Virus at the Forefront of Cancer Immunotherapy. **Cancers**, [S.L], v. 12, n. 12, p. 3552, 28 nov. 2020. DOI: 10.3390/cancers12123552

BUTT, S. L. *et al.* Tropism of Newcastle disease virus strains for chicken neurons, astrocytes, oligodendrocytes, and microglia. **BMC Veterinary Research**, [S.L], v. 15, n. 1, 4 set. 2019. DOI: 10.1186/s12917-019-2053-z

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. **Technical Report: Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Viruses**, 2023. Disponível em: [https://www.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2022-2023/h5n1-technical\\_report\\_december.htm](https://www.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2022-2023/h5n1-technical_report_december.htm). Acesso em: 18 jan. 2024.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Technical Report: Highly Pathogenic Avian Influenza A (H5N1) Viruses**, 27 de out. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2022-2023/h5n1-technical>. Acesso em: 20 de nov. 2023.

CHHEDA, U.; PRADEEPAN, S.; ESPOSITO, E.; STREZSAK, S.; FERNANDEZ-DELGADO, O.; KRANZ, J. Factors affecting stability of RNA – temperature, length, concentration, pH, and buffering species. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L], n.113, v. 2, p. 377-385, Epub 30 nov. 2023. DOI: 10.1016/j.xphs.2023.11.023

CINTRA, R. **Aves do Pantanal: 523 espécies incluindo cerca de 350 da Amazônia e 450 do Cerrado**. Manaus: INPA, 2014. 363 p. INPA. 376p.

COSTA, L. M. C.; MERCHAN-HAMANN, E. Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos cenários. **Revista Pan Amazônica de saúde**, [S.L], v.7, n. 11, p. 11-25, mar. 2016. Disponível em: [http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S21766223201600010002](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S21766223201600010002). Acesso em: 02 de set. 2023.

COWELL, M. A.; HAIG, S. M. **The Population Ecology and Conservation of Charadrius Plovers**. 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 2019. 342 p.

CRIADO, M. F.; MORESCO, K. A.; STALLKNECHT, D. E.; SWAYNE, D. E. Low-pathogenicity influenza viruses replicate differently in laughing gulls and mallards. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, [S.L], v. 15, n. 6, p. 701–706, 10 jun. 2021. DOI: 10.1111/irv.12878

CROVILLE, G. *et al.* Disclosing respiratory co-infections: a broad-range panel assay for avian respiratory pathogens on a nanofluidic PCR platform. **Avian Pathology**, [S.L], v. 47, n. 3, p. 253–260, 27 fev. 2018. DOI: 10.1080/03079457.2018.1430891

DA SILVEIRA, N. S.; VANCINE, M. H.; JAHN, A. E.; PIZO, M. A.; SOBRAL-SOUZA, T. Future climate change will impact the size and location of breeding and wintering areas of migratory thrushes in South America. **Ornithological Applications**, [S.L], v. 123, n. 2, 19 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ornithapp/duab006>. Acesso em: 12 fev. 2024.

DE ARAUJO, J. *et al.* Avian Influenza Virus (H11N9) in Migratory Shorebirds Wintering in the Amazon Region, Brazil. **PLoS ONE**, [S.L], v. 9, n. 10, p. e110141, 16 out. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110141>

DEUS, F. F.; SCHUCHMANN, K.-L.; MARQUES, M. I. Seasonality in the Brazilian Pantanal influences avian functional diversity. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, [S.L], v. 57, n. 3, p. 187–197, 09 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/01650521.2020.1842043>. Acesso em: 01 de fev. 2024.

DOU, D.; REVOL, R.; OSTBYE, H.; WANG, H; DANIELS, R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. **Frontiers in immunology**, [S.L], v. 9, n. 1581, 20 jul. 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01581

EMBRAPA. Embrapa Suínos e Aves. **Central de inteligência de Aves e Suínos – CIAS**, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>. Acesso em: 21 out. 2023

ESPOSITO, M.; TURKU, S.; LEHRFIELD, L.; SHOMAN, A. The Impact of Human Activities on Zoonotic Infection Transmissions. **The Impact of Human Activities on Zoonotic Infection Transmissions**, [S.L], v. 13, n. 10, p. 1646–1646, 15 maio 2023. DOI: 10.3390/ani13101646

FLORES, E. D. *Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas*. 3. ed. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 2017. cap. 30, p. 810-815.

GERMERAAD, E. A.; SANDERS, P.; HAGENAARS, T. J.; JONG, M. C. M.; BEERENS, N.; GONZALES, J.L. Virus Shedding of Avian Influenza in Poultry: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Viruses**, [S.L], v. 11, n. 9, p. 812, 02 set. 2019. DOI: 10.3390/v11090812

GHAJ, R. R. *et al.* A generalizable one health framework for the control of zoonotic diseases. **Scientific Reports**, [S.L], v. 12, n. 1, p. 8588, 21 maio 2022. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-022-12619-1#citeas>>. Acesso em: 9 set. 2022.

GILBERTSON, B.; SUBBARAO, K. Mammalian infections with highly pathogenic avian influenza viruses renew concerns of pandemic potential. **Journal of Experimental Medicine**, [S.L], v. 220, n. 8, p. e20230447, 16 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20230447>. Acesso em: 02 de set. 2023.

Gogoi, P.; Ganar, K.; Kumar, S. Avian Paramyxovirus: A Brief Review. **Transbound and emerging diseases**, [S.L], v.11, n.1, p. 53-57, fev. 2017. DOI: 10.1111/tbed.12355

GORAICHUK, I. V.; HARDEN, M.; SPACKMAN, E.; SUAREZ, D. L. The 28S rRNA RT-qPCR assay for host depletion evaluation to enhance avian virus detection in Illumina and Nanopore sequencing. **Frontiers in microbiology**, [S.L], v. 15, p. 1328987, 31 jan. 2024. PMID: 38351914

HAHN, S. *et al.* Short- and long-distance avian migrants differ in exercise endurance but not aerobic capacity. **BMC Zoology**, [S.L], v. 7, n. 1, 02 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40850-022-00134-9>

HAVASI, A.; VISAN, S.; CAINAP, C.; CAINAP, S. S.; MIHAILA, A. A.; POP, L.-A. Influenza A, Influenza B, and SARS-CoV-2 Similarities and Differences – A Focus on Diagnosis. **Frontiers in Microbiology**, [S.L], v. 13, 20 jun. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.908525

HICKS, J. T.; DIMITROV, K. M.; AFONSO, C. L.; RAMEY, A. M.; BAHL, J. Global phylodynamic analysis of avian paramyxovirus-1 provides evidence of inter-host transmission and intercontinental spatial diffusion. **BMC Evolutionary Biology**, [S.L], v. 19, n. 108, p. 1-15, 24 maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1431-2>. Acesso em 10 de set. 2023.

HILL, N. J. *et al.* Ecological divergence of wild birds drives avian influenza spillover and global spread. **PLOS Pathogens**, [S.L], v. 18, n. 5, p. e1010062, 19 mai. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010062>

HIRSCHINGER, J.; VERGNE, T.; CORRE, T.; HINGRAT, Y.; GUERIN, J. L.; LE LOC'H, G. Exposure assessment for avian influenza and Newcastle disease viruses from peridomestic wild birds in a conservation breeding site in the United Arab Emirates. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.L], v. 69, n. 4, p. 2361-2372, 01 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.14253>. Acesso em 02 de set. 2023.

HIRSCHINGER, J.; VERGNE, T.; CORRE, T.; HINGRAT, Y.; GUERIN, J. L.; LE LOC'H, G. Exposure assessment for avian influenza and Newcastle disease viruses from peridomestic wild birds in a conservation breeding site in the United Arab Emirates. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.L], v. 69, n. 4, p. 2361-2372, jul. 2022. DOI: 10.1111/tbed.14253

HOFFMANN, E.; STECH, J.; GUAN, Y.; WEBSTER, R. G.; PEREZ, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, [S.L], v. 146, n. 12, p. 2275–2289, 01 dez. 2001. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s007050170002>. Acesso em: 06 fev. 2024.

HU, Z.; HE, X.; DENG, J.; HU, J.; LIU, X. Current situation and future direction of Newcastle disease vaccines. **Veterinary Research**, [S.L], v. 53, n. 1, p. 99, 26 nov. 2022. DOI: 10.1186/s13567-022-01118-w

ICMBio - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE **Relatório de áreas de concentração de aves migratórias no Brasil**. Ed. 4, Centro Nacional de Pesquisa e conservação de Aves Silvestres, CEMAVE, 2022. Disponível em: [https://cemave-sede.github.io/relatorio\\_aves/](https://cemave-sede.github.io/relatorio_aves/). Acesso em: 12 de jan. 2024.

ICMBio - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2019. **Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil**, Cabedelo, PB: CEMAVE/ ICMBio. 2019. ISSN: 2446-9750, 3a Edição, 2019/2020. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/relatorios/relatorio\\_de\\_rotas\\_e\\_areas\\_de\\_concentracao\\_de\\_aves\\_migratorias\\_brasil\\_3edicao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/relatorios/relatorio_de_rotas_e_areas_de_concentracao_de_aves_migratorias_brasil_3edicao.pdf). Acesso em: 05 de out. 2023.

INDEA (Instituto de Defesa Agropecuária de Mato Grosso). Ficha Técnica Influenza Aviária (IA). Programa Estadual de Sanidade Avícola do Estado de Mato Grosso (PESA – MT). **Departamento de Saúde Animal**, 2023. Disponível em: <https://www.indea.mt.gov.br/-/6099288-sanidade-avicola>. Acesso em 25 de nov. 2023.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) (2019). **Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil**. Disponível em: <https://repositorio.icmbio.gov.br/handle/cecav/1703>. Acesso em: 10 de jul. 2023.

Instituto Neoenergia. **Migratory Birds and their environment Flyways Brasil, 2020**. Disponível em: <https://www.neoenergia.com/en/w/as-aves-migratorias-e-seu-meio-ambiente#:~:text=Duas%20das%20mais%20importantes%20rotas,esp%C3%A9cies%20est%C3%A3o%20presentes%20naquele%20ambiente>. Acesso em: 06 fev. 2024.

IP, H. S.; UHM, S.; KILLIAN, M. L.; TORCHETTI, M. K. An Evaluation of Avian Influenza Virus Whole-Genome Sequencing Approaches Using Nanopore Technology. **Microorganisms**, [S.L], v. 11, n. 2, p. 529, 01 fev. 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11020529

IUCN Red LIST- BIRDLIFE INTERNATIONAL. **IUCN Red List of Threatened Species: *Charadrius collaris***. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org/species/22693842/163622696#habitat-ecology>. Acesso em: 01 fev. 2024.

JAHN, A. E. *et al.* Bird migration within the Neotropics. **The Auk**, [S.L], v. 137, n. 4, 31 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/auk/ukaa033>. Acesso em: 12 de set. 2023.

KIM, G.-S. *et al.* The difference of detection rate of avian influenza virus in the wild bird surveillance using various methods. **Journal of Veterinary Science**, [S.L], v. 20, n. 5, p.e56, 11 set. 2019. PMID: 31565899

KIM, H.; WEBSTER, R. G.; WEBBY, R. J. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. **Viral Immunology**, [S.L], v. 31, n. 2, p. 174–183, 01 mar. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1089/vim.2017.0141>

KUCHIPUDI, S. V. *et al.*, Sialic Acid Receptors: The Key to Solving the Enigma of Zoonotic Virus Spillover. **Viruses**, [S.L], v. 13, n. 2, p. 262, 01 fev. 2021. DOI: 10.3390/v13020262

LACONI, A. *et al.* Detection of avian influenza virus: a comparative study of the in silico and in vitro performances of current RT-qPCR assays. **Scientific Reports**, [S.L], v. 10, n. 1, p. 8441, 21 mai. 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-64003-6

LEE, D.-H.; CRIADO, M. F.; SWAYNE, D. E. Pathobiological Origins and Evolutionary History of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S.L], v. 11, n.2, p. a038679, 01 fev. 2021. DOI: 10.1101/cshperspect.a038679

LEGUIA, M. *et al.* Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru. **Nature Communications**, [S.L], v. 14, n. 1, p. 5489, 7 set. 2023. DOI: 10.1038/s41467-023-41182-0

LEGUIA, M. *et al.* Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru. **Nature Communications**, [S.L], v. 14, n. 1, p. 5489, 7 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41182-0>. Acesso em: 20 de set. 2023.

LEITE, A. T. M.; FISCHER, G.; HÜBNER, S. D. O.; DE LIMA, M.; VARGAS, G. D. Investigação de vírus de impacto na sanidade avícola em aves silvestres próximas a uma criação de aves coloniais em Pelotas, RS. **Science And Animal Health**, [S.L], v. 8, n. 1, p. 73–87, 11 nov. 2020. Disponível em: <https://periodicos.ufpel.edu.br/index.php/veterinaria/article/view/17601/12059>. Acesso em: 05 ago. 2023

LI, Y.-T.; LINSTER, M.; MENDENHALL, I. H.; SU, Y. C. F.; SMITH, G. J. D. Avian Influenza Viruses in humans: Lessons from past Outbreaks. **British Medical Bulletin**, [S.L], v. 132, n. 1, p. 81–95, 11 dez. 2019. DOI: 10.1093/bmb/ldz036

LICKFETT, T. M.; CLARK, E.; GEHRING, T. M.; ALM, E. W. Detection of Influenza A viruses at migratory bird stopover sites in Michigan, USA. **Infection Ecology & Epidemiology**, [S.L], v. 8, n. 1, p. 1474709, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1474709>. Acesso em: 16 de out. 2023.

LISOVSKI, S.; DIJK, J. G. B.; KLINKENBERG, D.; NOLET, B. A.; FOUCHIER, R. A. M.; KLAASSEN, M. The roles of migratory and resident birds in local avian influenza infection dynamics. **Journal of Applied Ecology**, [S.L], v. 55, n. 6, p. 2963–2975, 19 abr. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13154>. Acesso em: 02 fev. 2024.

LYCETT, S. J.; DUCHATEL, F.; DIGARD, P. A brief history of bird flu. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S.L], v. 374, n. 1775, p. 20180257, 6 mai. 2019. DOI: 10.1098/rstb.2018.0257

LYCETT, S. J. *et al.* Genesis and spread of multiple reassortants during the 2016/2017 H5 avian influenza epidemic in Eurasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L], v. 117, n. 34, p. 20814–20825, 7 ago. 2020. DOI: 10.1073/pnas.2001813117

MALMBERG, J. L.; MILLER, M. M.; JENNINGS-GAINES, J.; ALLEN, S. E. Mortality in Wild Turkeys (*Meleagris gallopavo*) Associated with Natural Infection with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (HPAI) Subclade 2.3.4.4. **Journal of Wildlife Diseases**, [S.L], v. 59, n. 4, 24 out. 2023. DOI: 10.7589/JWD-D-22-00161

MAO, Q. *et al.* Review detection of Newcastle disease virus. **Frontiers in Veterinary Science**, [S.L], v. 9, 02 ago. 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.936251

MARANDINO, A. *et al.* Spreading of the High-Pathogenicity Avian Influenza (H5N1) Virus of Clade 2.3.4.4b into Uruguay. **Viruses**, [S.L], v. 15, n. 9, p. 1906, 1 set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15091906>

MARIE, V.; GORDON, M. The (Re-)Emergence and Spread of Viral Zoonotic Disease: A Perfect Storm of Human Ingenuity and Stupidity. **Viruses**, [S.L], v. 15, n. 8, p. 1638–1638, 27 jul. 2023. DOI: 10.3390/v15081638

MAYERS, J.; MANSFIELD, K. L.; BROWN, I. H. The role of vaccination in risk mitigation and control of Newcastle disease in poultry. **Vaccine**, [S.L], v. 35, n. 44, p. 5974–5980, 20 out. 2017. DOI: 10.1016/j.vacina.2017.09.008

MEHRABADI, M.H.F. *et al.* Assessing the economic burden of multi-causal respiratory diseases in broiler farms in Iran. **Tropical Animal Health and Production**, [S.L], v. 54, n. 2, 27 fev. 2022. Springer Link. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03110-0>. Acesso em: 20 de set. 2023.

MENG, Q.; HE, J.; ZHONG, L.; ZHAO, Y. Advances in the Study of Antitumour Immunotherapy for Newcastle Disease Virus. **International Journal of Medical Sciences**. [S.L], v. 18, n. 11, p. 2294–2302, 30 mar. 2021. DOI: 10.7150/ijms.59185

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). **Ficha técnica Doença de Newcastle (DNC)**. Secretária de Defesa Agropecuária (SDA). **Departamento de Saúde Animal (DAS)**, 2022. Disponível em: [https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas\\_tecnicas/ficha\\_tecnica.html](https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas_tecnicas/ficha_tecnica.html). Acesso em: 25 de nov. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). **Ficha técnica Influenza Aviária (IA)**. Secretária de Defesa Agropecuária (SDA). **Departamento de Saúde Animal (DAS)**, 2023. Disponível em: [https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas\\_tecnicas/ficha\\_tecnica.html](https://sistemasweb.agricultura.gov.br/pages/fichas_tecnicas/ficha_tecnica.html). Acesso em: 25 de nov. 2023

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). Influenza Aviária. **Investigações de Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves realizadas pelo Serviço Veterinário Oficial**, 2023. Disponível em: <https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/extensions/SRN/SRN.html>. Acesso em: 13 de dez. 2023.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). **Plano de Vigilância de Influenza Aviária e Doença de Newcastle**. Secretária de Defesa Agropecuária, 2022. Disponível em: [https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/PlanodevigilncialADNC\\_06\\_07\\_2022.pdf](https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/PlanodevigilncialADNC_06_07_2022.pdf). Acesso em: 18 de dez. 2023.

MOSAAD, Z. *et al.* Emergence of Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus (H5N1) of Clade 2.3.4.4b in Egypt, 2021–2022. **Pathogens**, [S.L], v. 12, n. 1, p. 90–90, 05 jan. 2023. DOI: 10.3390/pathogens12010090

NILSSON, J. *et al.* Expression of influenza A virus glycan receptor candidates in mallard, chicken, and tufted duck. **Glycobiology**, [S.L], p. 1-14, 22 dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad098>

NOGUEIRA, T.; PONCE, R. O vírus da Gripe. **Revista de Ciência Elementar**, [S.L], v. 9, n. 2, p. 038, jun. 2021. DOI: <http://doi.org/10.24927/rce2021.038>

NUNES, A. P. *et al.* Birds of the Pantanal floodplains, Brazil: historical data, diversity, and conservation. **Papéis Avulsos de Zoologia**, [S.L], v. 61, p. e20216182, 27 set. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2021.61.82>. Acesso em: 20 jan. 2024.

NUNES, A.P.; TOMAS, W. M. Aves migratórias ocorrentes no Pantanal: Caracterização e Conservação, Embrapa, 2008. Publicação online. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/811658/1/DOC62.pdf>. Acesso em: 25 de jul. 2023.

NURZIJAH, I.; ELBOHY, O. A.; KANYUKA, K.; DALY, J. M.; DUNHAM, S. Development of Plant-Based Vaccines for Prevention of Avian Influenza and Newcastle Disease in Poultry. **Vaccines**, [S.L], v. 10, n. 3, p. 478, 19 mar. 2022. DOI: 10.3390/vaccines10030478

OLIVEIRA, I. L.; RECHETELO, J.; MESTRE, L. A. M. Percepção da avifauna de entremarés por moradores e turistas locais da Ilha do Mel, litoral do Paraná. **Revista CEPsul- Biodiversidade e Conservação Marinha**, [S.L], vol. 11, p. 1-12, 06 jun. 2022. Disponível em: <https://revistaeletronica.icmbio.gov.br/cepsul/article/view/1427>. Acesso em: 18 de jan. 2024.

Ono, J. M.; Lima, C. B.; Ribeiro, L. F. Doença de Newcastle. **Revista GETEC**, [S.L], v.10, n.25, p. 9-13, 23 fev. 2021. Disponível em: <https://revistas.fucamp.edu.br/index.php/getec/article/view/2326>, Acesso em: 10 de set. 2023.

Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH). Chapter 3. 3. 14. Newcastle disease (Infection with Newcastle Disease Vírus). **Terrestrial Manual**, 2021. Disponível em: <https://www.woah.org/en/disease/newcastle-disease/>. Acesso em: 10 de set. 2023.

Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH). Chapter 3. 3. 4. Avian influenza (Including infection with High Pathogenicity Avian Influenza Viruses). **Terrestrial Manual**, 2021. Disponível em: <https://www.B.org/en/disease/avian-influenza/>. Acesso em: 12 de set. 2023.

Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS). **Avaliação de risco à saúde pública relacionada aos surtos de influenza aviária de alta patogenicidade (IAAP) (H5N1), clado 2.3.4.4b, em espécies animais na Região das Américas, 20 de set. 2023.** Disponível em: <https://www.paho.org/pt/documentos/avaliacao-risco-saude-publicarelacionada-aos-surtos-influenza-aviaria-alta>. Acesso em: 02 de nov. 2023.

PACHECO, J. F. *et al.* Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos – segunda edição. **Zenodo**. 26 jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5138368>. Acesso em: 10 de jul. 2023.

PALUDO, D.; ALVES, M.; DOS SANTOS, R. S.; LEMOS, L.; ZIBETTI, A. W.; HENSBERGE, H. Aves Limícolas na Praia do Parque Nacional da Lagoa do Peixe e do Entorno: Análise dos Censos Conduzidos entre os Anos de 2012 e 2021. **Biodiversidade Brasileira**, [S.L], v. 12, n. 4, p. 1-32, 27 set. 2022. DOI:

PAOH- Pan American Health Organization. **Epidemiological Update - Outbreaks of avian influenza caused by influenza A (H5N1) in the Region of the americas - August 2023**, 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-outbreaks-avian-influenza-caused-influenza-ah5n1-region-americas-0>. Acesso em: 05 dez. 2023.

PARDO-ROA, C. *et al.* Cross-species transmission and PB2 mammalian adaptations of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 viruses in Chile. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, [S.L], 30 jun. 2023. DOI: 10.1101/2023.06.30.547205

PARK, H.-C.; SHIN, J.; CHO, S.-M.; KANG, S.; CHUNG, Y.-J.; JUNG, S.-H. PAIVS: prediction of avian influenza virus subtype. **Genomics & Informatics**, [S.L], v. 18, n. 1, p. e56, 31 mar. 2020. DOI: 10.5808/GI.2020.18.1.e5

PATER, A. A. *et al.* High throughput nanopore sequencing of SARS-CoV-2 viral genomes from patient samples. **Journal of Biological Methods**, [S.L], v. 8, n. COVID 19 Spec Iss, p. e155, 27 set. 2021. DOI: 10.14440/jbm.2021.360

PEREIRA, M. R. *et al.* Identification of a Virulent Newcastle Disease Virus Strain Isolated from Pigeons (*Columbia livia*) in Northeastern Brazil Using Next-Generation Genome Sequencing. **Viruses**, [S.L], v. 14, n. 7, p. 1579, 21 jul. 2022. DOI: 10.3390/v14071579

PEREIRA, P. D. C. **Neuroecologia de aves da família Charadriidae: Estudos arquitetônicos, Estereológicos e Filogenéticos**. 2017. 107 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Ambiental) - Instituto de Estudos Costeiros, Universidade Federal do Pará, Bragança, Pará, 2017.

PINTO, L. B. *et al.* Investigation of Influenza A, West Nile and Newcastle Disease Viruses in Birds from the Pantanal Wetlands of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, [S.L], v. 18, n. 2, p. 291–298, mai-jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0111>

QUICK, J. nCoV-2019 sequencing protocol v3 (LoCost). **Protocols.io**, 25 ago. 2020. DOI: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l6n26rgqe/v3](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l6n26rgqe/v3)

RAHMAN, A. -; HABIB, M.; SHABBIR, M. Z. Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) in Feral Birds and their Potential Role in Interspecies Transmission. **The Open Virology Journal**, [S.L], v. 12, n. 1, p. 52-68, 31 ago. 2018. DOI: 10.2174/1874357901812010052

RAMEY, A. M. *et al.* Highly pathogenic avian influenza is an emerging disease threat to wild birds in North America. **The Journal of Wildlife Management**, [S.L], v. 86, n. 2, 11 jan. 2022. The Wildlife Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jwmg.22171>. Acesso em: 20 de set. 2023.

RECHT, J.; SCHUENEMANN, V. J.; SÁNCHEZ-VILLAGRA, M. R. Host Diversity and Origin of Zoonoses: The Ancient and the New. **Animals**, [S.L], v. 10, n. 9, p. 1-14, 17 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10091672>. Acesso em: 12 de set. 2023.

REHMAN, S. *et al.* Avian influenza (H5N1) virus, epidemiology and its effects on backyard poultry in Indonesia: a review. **F1000Research**, [S.L], v. 11, p. 1321, 17 fev. 2023. DOI: 10.12688/f1000research.125878.2

REISCHAK, D. *et al.* First report and genetic characterization of the highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus in Cabot's tern (*Thalasseus acufavidus*), Brazil. **Veterinary and Animal Science**, [S.L], v. 22, p. 100319, 01 dez. 2023. ScienceDirect. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vas.2023.100319> . Acesso em: 28 de dez. 2023.

RODRIGUES, M. P. *et al.* Spatial-temporal distribution of avian diseases in Brazil, and the establishment of association with national avian surveillance program. **CIÊNCIA ANIMAL E VETERINÁRIA: INOVAÇÕES E TENDÊNCIAS - VOLUME 3**, [S.L], v. 3, n. 1, p. 171–180, 01 out. 2022. Disponível em: <https://downloads.editoracientifica.com.br/articles/220910118.pdf>. Acesso em: 28 de nov. 2023.

SCAR – Scientific Committee on Antarctic Research. **Biological Risk Assessment of Highly Pathogenic Avian Influenza in the Southern Ocean Document prepared by On behalf of the SCAR Antarctic Wildlife Health Network**, 2023 Disponível em: <https://scar.org/library-data/science/life-sciences/eg-bamm/biological-risk-assessment-of-highly-pathogenic-avian-influenza-in-the-southern-ocean>. Acesso em: 10 fev. 2024.

SCAR- Scientific Committee on Antarctic Research. **Sub-Antarctic and Antarctic Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Monitoring Project | SCAR**, 2024. Disponível em: <https://scar.org/library-data/avian-flu#reporting>. Acesso em: 12 fev. 2024.

SERRANO, I. L. **Distribuição e conservação de aves migratórias neárticas da ordem Charadriiformes (famílias Charadriidae e Scolopacidae) no Brasil**. 2010. 193 p. Dissertação (Doutorado em Zoologia) - Museu Paraense Emílio Goeldi, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

SHI, J.; ZENG, X.; CUI, P.; YAN, C.; CHEN, H. Alarming Situation of Emerging H5 and H7 Avian Influenza and Effective Control Strategies. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L], v. 12, n. 1, p. e2155072, 12 dez. 2022. DOI: 10.1080/22221751.2022.2155072

SIBBr - Sistema de informação sobre a Biodiversidade Brasileira. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil e Lista da Flora do Brasil 2020**. Disponível em: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/138972#names>. Acesso em: 15 jan. 2024.

SINGH, S.; SINHA, M.; KUMARI, V.; GUPTA, B. K.; ARIF, M. An Outlook on Migration of Birds and types of Geographical Migratory Patterns. **International Journal of Advancement in Life Sciences Research**, [S.L], v. 3, n. 4, p. 1–8, 31 out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.31632/ijalsr.20.v03i04.001>

SINGH, S.; SINHA, M.; KUMARI, V.; GUPTA, B. K.; ARIF, M. An Outlook on Migration of Birds and types of Geographical Migratory Patterns. **International Journal of Advancement in Life Sciences Research**, [S.L], v. 3, n. 4, p. 1–8, 31 out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.31632/ijalsr.20.v03i04.001>

SOMENZARI, M. *et al.* An overview of migratory birds in Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, [S.L], v. 58. p. 1-66, 20 fev. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/1807-0205/2018.58.03>. Acesso em: 12 de jul. 2023.

SOMVEILLE, M.; BAY, R. A.; SMITH, T. B.; MARRA, P. P.; RUEGG, K. C. A general theory of avian migratory connectivity. **Ecology Letters**, [S.L], v. 24, n. 9, p. 1848–1858, 25 jun. 2021. DOI: 10.1111/ele.13817

SOUZA, A. E. B. A.; LIMA, D. M.; SOUZA, E. A.; NASCIMENTO, C. M. S.; COSTA, F. G.; ARANTES, M. S. **Guia de Aves da Floresta Nacional da Restinga de Cabedelo**. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, 2023. 168 p.

SOUZA, S. O. *et al.* Pathological and molecular findings of avian avulavirus type 1 outbreak in pigeons (*Columba livia*) of southern Brazil. **Pesquisa Veterinária**

**Brasileira**, [S.L], v. 38, n. 12, p. 2254–2261, dez. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5528>. Acesso em: 20 de set. 2023.

SPACKMAN, E. **Animal Influenza Virus: Methods and Protocols**. 3. ed. Athens, GA: Editora Humana Press, 2020. Cap. 8, p. 100-107.

SPACKMAN, E. **Animal Influenza Virus: Methods and Protocols**. 3. ed. Athens, GA: Editora Humana Press, 2020. Cap. 12, p. 154-169.

Spackman, E. *et al.* Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L], v. 40, n. 9, p. 3256-3260, 01 set. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002>

TAMMIRANTA, N. *et al.* Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infections in wild carnivores connected to mass mortalities of pheasants in Finland. **Infection, Genetics and Evolution**, [S.L], v. 111, p. 105423–105423, 01 jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105423>

THOMAZELLI, L. M. *et al.* An Outbreak in Pigeons Caused by the Subgenotype VI.2.1.2 of Newcastle Disease Virus in Brazil. **Viruses**, [S.L], v. 13, n. 12, p. 2446, 06 dez. 2021. DOI: [10.3390/v13122446](https://doi.org/10.3390/v13122446)

THOMPSON, A. J.; PAULSON, J. C. Adaptation of influenza viruses to human airway receptors. **Journal of Biological Chemistry**, [S.L], v. 296, p. 100017, 03 nov. 2020. Disponível em: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(20\)00003-4/fulltext](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(20)00003-4/fulltext). Acesso em: 15 de set. 2023.

TIAN, J. *et al.* Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b Introduced by Wild Birds, China, 2021. **Emerging Infectious Diseases journal – CDC**, [S.L], v. 29, n. 7, p. 1367-1375, 2020. Disponível em: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/29/7/22-1149\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/29/7/22-1149_article). Acesso em: 28 de set. 2023.

TROGU, T. *et al.* Survey on the Presence of Viruses of Economic and Zoonotic Importance in Avifauna in Northern Italy. **Microorganisms**, [S.L], v. 9, n. 9, p. 1-12, 15 set. 2021. DOI: [10.3390/microorganisms9091957](https://doi.org/10.3390/microorganisms9091957)

TZARUM, N. What has been will be again – The story of viral pathogens. **Cell Host & Microbe**, [S.L], v. 30, n. 4, p. 480-482, 13 abr. 2022. DOI: [10.1016/j.chom.2022.03.031](https://doi.org/10.1016/j.chom.2022.03.031)

UL-RAHMAN, A.; ISHAQ, H. M.; RAZA, M. A.; SHABBIR, M. Z. Zoonotic potential of Newcastle disease virus: Old and novel perspectives related to public health. **Reviews in Medical Virology**, [S.L], v. 32, n. 1, p. e2246, 10 mai. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/rmv.2246>. Acesso em: 28 de nov. 2023.

VAN DEN BRAND, J. M. A. *et al.* Wild ducks excrete highly pathogenic avian influenza virus H5N8 (2014–2015) without clinical or pathological evidence of

disease. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L], v. 7, n. 1, p. 1–10, 18 abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0070-9>

VENKATESAN, P. Avian influenza spillover into mammals. **The Lancet Microbe**, [S.L], v. 4, n. 7, p. 492, 26 mai. 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00173-8)

VERHAGEN, J. H.; FOUCHIER, R. A. M.; LEWIS, N. Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild–Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance. **Viruses**, [S.L], v. 13, n. 2, p. 212, 1 fev. 2021. DOI: [10.3390/v13020212](https://doi.org/10.3390/v13020212)

WALSH, M. G.; MOR, S. M.; HOSSAIN, S. Highly Pathogenic Avian Influenza (H5N1) Landscape Suitability Varies by Wetland Habitats and the Degree of Interface between Wild Waterfowl and Poultry in India. **Viruses**, [S.L], v. 12, n. 11, p. 1290, 11 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/v12111290>. Acesso em: 12 de out. 2023.

WANG, D.; ZHU, W.; YANG, L.; SHU, Y. The Epidemiology, Virology, and Pathogenicity of Human Infections with Avian Influenza Viruses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, [S.L], v. 11, n. 4, p. a038620, 21 jan. 2020. DOI: [10.1101/cshperspect.a038620](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038620)

WANG, X.; STELZER-BRAID, S.; SCOTCH, M.; RAWLINSON, W. D. Detection of respiratory viruses directly from clinical samples using next-generation sequencing: A literature review of recent advances and potential for routine clinical use. **Reviews in Medical Virology**, [S.L], v. 32, n. 5, p. e2375 jul. 2022. DOI: [10.1002/rmv.2375](https://doi.org/10.1002/rmv.2375)

WELCH, C. N. *et al.* Genomic comparison of Newcastle disease viruses isolated in Nigeria between 2002 and 2015 reveals circulation of highly diverse genotypes and spillover into wild birds. **Archives of Virology**, [S.L], v. 164, n. 8, p. 2031–2047, 23 maio 2019. DOI: [10.1007/s00705-019-04288-9](https://doi.org/10.1007/s00705-019-04288-9)

WIERSMA, P.; KIRWAN, G. M. Collared Plover (*Anarhynchus collaris*), version 1.1. **Birds of the World**, 2023. Disponível em: <https://birdsoftheworld.org/bow/species/colplo1/1.1/introduction>. Acesso em: 07 fev. 2024.

WIKI AVES - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em: [www.wikiaves.com.br](http://www.wikiaves.com.br). Acesso em: 25 de jul. 2023.

Wise, M. G. *et al.* Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L], v. 42, n.1, p. 329-338, jan. 2004. DOI: [10.1128/JCM.42.1.329-338.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.329-338.2004)

World Organisation for Animal Health (WOAH). Infection With High Pathogenicity Avian Influenza Viruses. **Código Sanitário dos Animais Terrestres**, 2023. Disponível em:

[https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2023/chapitre\\_avian\\_influenza\\_viruses.pdf.htm](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2023/chapitre_avian_influenza_viruses.pdf.htm)Acesso em: 28 set. 2023.

WU, Q. *et al.* Development and evaluation of Newcastle disease - avian influenza bivalent vector vaccines in commercial chickens. **International Immunopharmacology**, [S.L], v. 120, p. 110363, 1 jul. 2023. ScienceDirect. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.110363>. Acesso em: 21 de set. 2023.

YADAV, M. P.; SINGH, R. K.; MALIK, Y. S. Emerging and Transboundary Animal Viral Diseases: Perspectives and Preparedness. **Emerging and Transboundary Animal Viruses**, [S.L], p. 1–25, 23 fev. 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-0402-0\_1

ZHANG, D.; DING, Z.; XU, X. Pathologic Mechanisms of the Newcastle Disease Virus. **Viruses**, [S.L], v. 15, n. 4, p. 864–864, 28 mar. 2023. DOI: 10.3390/v15040864

ZHANG, G. *et al.* Bidirectional Movement of Emerging H5N8 Avian Influenza Viruses Between Europe and Asia via Migratory Birds Since Early 2020. **Molecular Biology and Evolution**, [S.L], v. 40, n. 2, 27 jan. 2023. DOI: 10.1093/molbev/msad019

ZHAO, C.; PU, J. Influence of Host Sialic Acid Receptors Structure on the Host Specificity of Influenza Viruses. **Viruses**, [S.L], v. 14, n. 10, p. 2141, 28 set. 2022. DOI: 10.3390/v14102141

ZHOU, B. *et al.* Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. **Journal of Virology**, [S.L], v. 83, n. 19, p. 10309–10313, out. 2009. DOI: 10.1128/JVI.01109-09

## 8 APÊNDICE A – ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA

### Investigação molecular dos Vírus Influenza A e Avulavírus aviário sorotipo 1 em aves silvestres no estado de Mato Grosso, Brasil

Tayane Bruna Soares Magalhães  
Graduada em Medicina Veterinária  
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)  
Endereço: Av. Fernando Correa da Costa, Nº 2.367, Boa Esperança,  
Cuiabá - MT  
CEP: 78060-900  
E-mail: [tayane.bruna16@hotmail.com](mailto:tayane.bruna16@hotmail.com)

Daniel Moura de Aguiar  
Doutor em Medicina Veterinária (Epidemiologia Experimental Aplicada às  
Zoonoses)  
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)  
Endereço: Av. Fernando Correa da Costa, Nº 2.367, Boa Esperança,  
Cuiabá – MT  
E-mail: [daniel.aguiar@ufmt.br](mailto:daniel.aguiar@ufmt.br)  
CEP: 78060-900

Nathalia de Assis Pereira  
Graduada em Medicina Veterinária  
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)  
Endereço: Av. Fernando Correa da Costa, Nº 2.367, Boa Esperança,  
Cuiabá - MT  
CEP: 78060-900  
E-mail: [nathy\\_assis\\_15@hotmail.com](mailto:nathy_assis_15@hotmail.com)

João Batista de Pinho  
Doutor em Ecologia (Conservação e Manejo da Vida Silvestre)  
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)  
Endereço: Av. Fernando Correa da Costa, Nº 2.367, Boa Esperança,  
Cuiabá - MT  
CEP: 78060-900  
E-mail: [pinhoufmont@gmail.com](mailto:pinhoufmont@gmail.com)

Elaine da Rosa Bueno  
Mestra em Ecologia e Conservação da Biodiversidade  
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT)  
Endereço: Av. Fernando Correa da Costa, Nº 2.367, Boa Esperança,  
Cuiabá – MT  
CEP: 78060-900  
E-mail: [elainerosabio@gmail.com](mailto:elainerosabio@gmail.com)

Jansen de Araújo  
Doutor em Microbiologia  
Instituição: Universidade de São Paulo (USP)

Endereço: Rua da Praça do Relógio, 109, Butantã, São Paulo – SP  
CEP: 05508-050  
E-mail: jansentequila@usp.br

Edison Luiz Durigon  
Doutor em Ciências Biológicas  
Instituição: Universidade de São Paulo (USP)  
Endereço: Rua da Praça do Relógio, 109, Butantã, São Paulo – SP  
CEP: 05508-050  
E-mail: eldurigo@usp.br.

## RESUMO

As aves silvestres aquáticas das ordens Anseriformes e Charadriiformes são hospedeiras naturais do vírus da influenza aviária (AIV) e do vírus da doença de Newcastle. As espécies migratórias desempenham um papel significativo na disseminação intra e intercontinental desses patógenos, além de contribuírem para amplificação e manutenção viral em ambientes silvestres. A ocorrência de transbordamento viral interespecies não é incomum, portanto, o monitoramento epidemiológico que visa detectar a circulação desses vírus na avifauna é imprescindível, principalmente em locais que funcionam como sítios de escala e invernada de aves migrantes. O estado de Mato Grosso (MT), situado no Brasil Central, é percorrido por duas importantes rotas migratórias intercontinentais, onde alguns sítios de concentração aviária estão localizados em regiões periurbanas, sendo comumente observado o contato próximo entre a fauna silvestre, doméstica e seres humanos. Esse estado é composto por três biomas ricos em biodiversidade: Amazônia, Cerrado e Pantanal, nos quais já foram catalogadas 916 espécies diferentes de aves silvestres. Tendo em vista as características ecológicas do estado de MT, o objetivo desta pesquisa foi investigar indícios de atividade viral de AIV e NDV na avifauna local. Ao todo, foram testadas para ambos agentes, pela técnica de RT-qPCR 1.138 amostras de swabs orotraqueais e cloacais. Resultado positivo para Alphainfluenzavirus foi detectado em amostra coletada de uma ave silvestre pertencente à espécie *Charadrius collaris*, capturada na Baía de Chacororé, localizada no município de Barão de Melgaço (MT). A amostra positiva foi submetida ao sequenciamento genômico (NGS), mas não foi possível obter o genoma completo para

confirmação do subtipo viral. Todas as demais amostras testaram negativas para ambos agentes. O monitoramento epidemiológico na região e novas buscas deverão ser realizadas para investigação desses vírus na região do Pantanal mato-grossense.

**Palavras-chave:** *Charadrius collaris*. Pantanal. RT-qPCR. Vigilância epidemiológica.

## INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 75% das doenças infecciosas emergentes e reemergentes sejam de origem zoonótica, e cerca de 80% são causadas por patógenos virais. As aves silvestres aquáticas das ordens Anseriformes e Charadriiformes são os reservatórios naturais dos vírus de baixa patogenicidade da influenza aviária e do vírus da doença de Newcastle. A infecção nesses grupos de aves geralmente é assintomática, e estas contribuem significativamente na disseminação global desses patógenos (TROGU *et al.*, 2021; ARAUJO *et al.*, 2018).

A influenza aviária (AIV) e a doença de Newcastle (DNC) estão entre as principais enfermidades virais altamente transmissíveis que acometem as aves, podendo inclusive causar infecções em humanos (HIRSCHINGER *et al.*, 2021; NGUYEN *et al.*, 2019; FLORES, 2017). Essas doenças representam grandes problemas socioeconômicos, de saúde pública e ambiental em países onde são endêmicas, bem como em regiões onde novos surtos são identificados. A detecção de cepas virulentas do NDV e de cepas altamente patogênicas do AIV geralmente levam ao embargo do comércio internacional de aves e de seus subprodutos nas regiões afetadas, causando grandes prejuízos financeiros (TROGU *et al.*, 2021; RECHT, SCHUENEMANN E SÁNCHEZ-VILLAGRA, 2020).

Os vírus *Influenza A* e o *Avulavirus aviário sorotipo 1* (APMV-1) são os agentes etiológicos responsáveis por essas enfermidades. Ambos possuem distribuição mundial e seus hospedeiros naturais são as aves silvestres das ordens Anseriformes (patos, cisnes e gansos) e Charadriiformes (gaivotas, andorinhas e aves costeiras) (RAHMAN; HABIB; SHABBIR, 2018). Diversas cepas desses agentes já foram identificadas em diferentes ordens aviárias, estando associadas a ocorrência de *spillover* a partir de espécies silvestres (HILL *et al.*, 2022; WELCH *et al.*, 2019). Esses vírus se replicam continuamente nos sistemas respiratório e gastrointestinal de forma assintomática em seus hospedeiros naturais, sendo eliminados em altas quantidades nas secreções oronasais e fezes. Portanto, as principais vias de transmissão incluem: o contato direto entre aves portadoras e suscetíveis, aerossóis, secreções respiratórias e via fecal-oral (ONO; LIMA; RIBEIRO, 2021; BODEWES; KUIKEN, 2018; FLORES, 2017). Esta última é predominantemente importante em ambientes aquáticos, onde as partículas virais presentes nas fezes de aves infectadas podem permanecer viáveis em zonas úmidas como rios, lagos, lagoas e praias por longos períodos. Essa via de transmissão também está diretamente relacionada com a

manutenção viral em ambientes selvagens, permitindo a infecção entre populações aviárias separadas espacial ou temporalmente (BLAGODATSKI *et al.*, 2021; ARAUJO *et al.*, 2018; LICKFETT, *et al.*, 2018).

Aves migratórias desempenham papel importante na disseminação de microrganismos, transportando-os por longas distâncias territoriais e promovendo a propagação intracontinental e intercontinental (SINGH *et al.*, 2020; HICKS *et al.*, 2019). Além disso, contribuem significativamente para amplificação viral no ambiente e na ocorrência de processos mutacionais e evolutivos de ambos os agentes (MOSAAD *et al.*, 2023; TROGU *et al.*, 2021). Surtos de IA e DNC têm sido associados a presença de aves migratórias em grandes regiões geográficas como Ásia, Europa e América do Norte (RAMEY *et al.*, 2022, VELKERS *et al.*, 2020; WELCH *et al.*, 2019), onde programas de vigilância ativa para IA realizados demonstram que as detecções de cepas de influenza aviária de alta patogenicidade (HPAI) coincidem espaço temporalmente com relatos de surtos e aumento na mortalidade de aves selvagens (RAMEY *et al.*, 2022).

Os subtipos virais altamente patogênicos do vírus influenza A (HPAI) representam um grande risco zoonótico devido à sua alta mutabilidade, o que eleva as probabilidades de transbordamentos virais interespecies (spillover). Essa plasticidade mutacional e evolutiva dos AIVs os tornam uma grande ameaça à saúde global da população humana e a biodiversidade da fauna, uma vez que a ocorrência de spillover entre aves e mamíferos tem sido relatados ao longo dos anos (PARDO-ROA *et al.*, 2023; MARANDINO *et al.*, 2023; LYCETT *et al.*, 2020).

Atualmente, uma epidemia global de HPAI H5N1 (clado 2.3.4.4b) está em curso, iniciada no ano de 2020 e persistindo até o presente momento, essa estirpe viral continua a disseminar-se por regiões de difícil alcance ao redor do mundo. Originária da Ásia, espalhou-se para toda a Europa e, posteriormente, para os continentes Africano e Americano, causando surtos com mortalidade massiva em aves silvestres e domésticas (TIAN *et al.*, 2023).

Em outubro de 2022, o HPAI (H5N1) adentrou a América do Sul, espalhando-se rapidamente ao longo da costa do Pacífico e causando infecções sem precedentes em diversas espécies de aves e mamíferos aquáticos (GILBERTSON; SUBBARAO, 2023; LEGUIA *et al.*, 2023). Essa cepa viral tem demonstrado elevado potencial de rearranjo genético, resultando em propagações multiespecies com transbordamentos virais entre diferentes espécies de aves, mamíferos terrestres e aquáticos (focas,

leões marinhos, gambas, guaxinins, visons, ursos, entre outros), além de humanos. Esses eventos têm ocorrido em uma escala de frequência e dimensões inéditas, gerando grandes preocupações entre a comunidade científica devido á possibilidade de uma nova pandemia causada por um vírus influenza (LEGUIA *et al.*, 2023; TAMMIRANTA *et al.*, 2023; VENKATESAN, 2023).

O estado de Mato Grosso, localizado na região Centro Oeste do Brasil, possui áreas de escalas utilizadas por aves migratórias setentrionais e meridionais ao longo do ano. Devido á sua localização geográfica privilegiada e a variedade de habitats, é o único estado do país a apresentar três biomas distintos (Amazônia, Pantanal e Cerrado). Essas variedades de ecossistemas servem como ponto de descanso e reprodução para diversas espécies durante suas jornadas sazonais. Essas aves que atravessam a região central do país utilizam comumente duas rotas migratórias principais: a Rota do Brasil Central e Rota Amazônia Central/Pantanal. Ambas se comunicam com as grandes Flyways intercontinentais, tornado essa região propícia á entrada de patógenos virais carregados pela avifauna silvestre (BOURSCHEID *et al.*, 2020; ICMBIO, 2019).

O primeiro surto de HPAI (H5N1) no Brasil ocorreu em maio de 2023, no estado do Espírito Santo, afetando um grande número de aves aquáticas limícolas. Atualmente, somam-se 148 surtos confirmados em aves silvestres e 03 casos em aves de subsistência (MAPA, 2023). Diante do atual cenário nacional de propagação do HPAI (H5N1) e dos riscos econômicos e ambientais representados pelos AIVs, juntamente com o NDV, como os principais patógenos responsáveis pela Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves, capazes de produzir altas taxas de morbidade e mortalidade na população aviária comercial, nas criações de subsistência e na rica avifauna do estado de Mato Grosso, preconizou-se nessa pesquisa realizar uma avaliação epidemiológica da circulação desses vírus em cinco municípios do estado (Cuiabá, Barão de Melgaço, Nobres, Poconé e Santo Antônio do Leverger) . Esses municípios foram escolhidos por abrigarem grandes regiões periurbanas onde é comum observar o contato íntimo entre a fauna silvestre, doméstica e seres os humanos.

Há uma lacuna de informações sobre quais espécies migratórias podem estar associadas á uma possível introdução de agentes virais no estado de Mato Grosso, assim como as espécies residentes que podem funcionar como reservatórios e que possam perpetuar a propagação viral. Com base no exposto, nosso objetivo foi

conduzir investigações epidemiológicas por meio de vigilância ativa, utilizando a técnica molecular (RT-qPCR), para monitorar e detectar precocemente a circulação de AIV's e NDV em aves silvestres no estado de Mato Grosso, Brasil.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Material biológico**

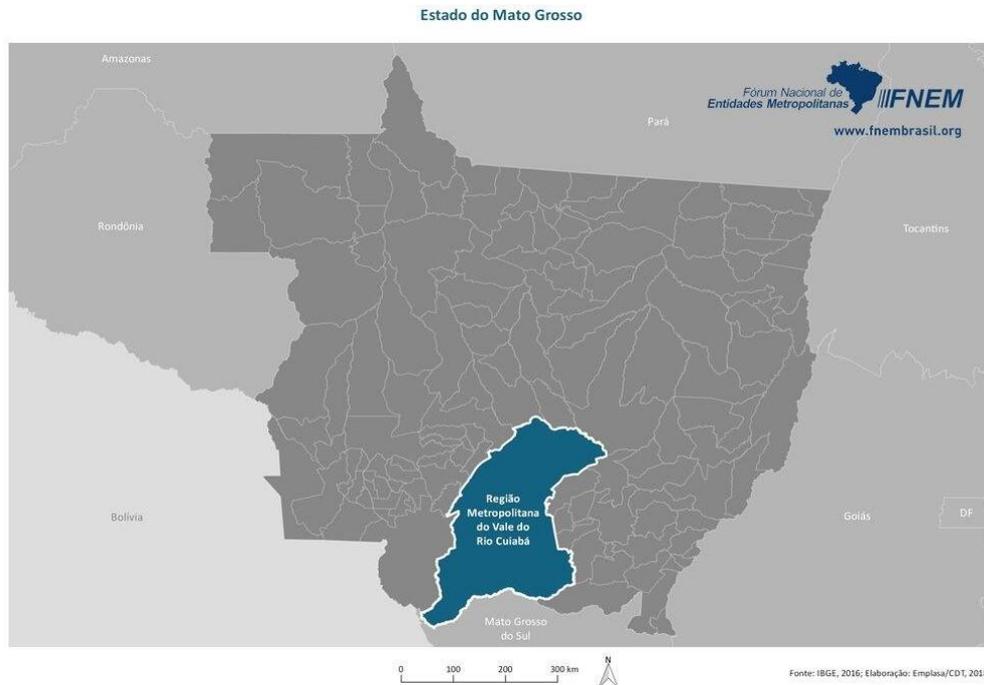
As amostras biológicas utilizadas na pesquisa foram provenientes de coletas realizadas para o projeto “Monitoramento de SARS-COV-2, Coronavírus e vírus da Influenza no Pantanal”, autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais sob o protocolo de número: 23108.085496/2020-32.

Todas as áreas de amostragem foram orientadas pela equipe de ornitólogos visando a ampla variedade populacional de aves residentes, locais com fluxo de aves migratórias, assim como a proximidade das regiões com centros urbanos.

As coletas de amostras foram conduzidas em 17 campanhas que abrangeram cinco municípios do estado de Mato Grosso: Cuiabá, Barão de Melgaço, Nobres, Poconé e Santo Antônio do Leverger (Figuras 1 e 2), durante um período de três anos (2021-2023). Dentro do município de Barão de Melgaço, três microrregiões foram selecionadas como pontos estratégicos para captura de aves aquáticas: Baía do Chacororé, Baía Siá Mariana e Baía São João.

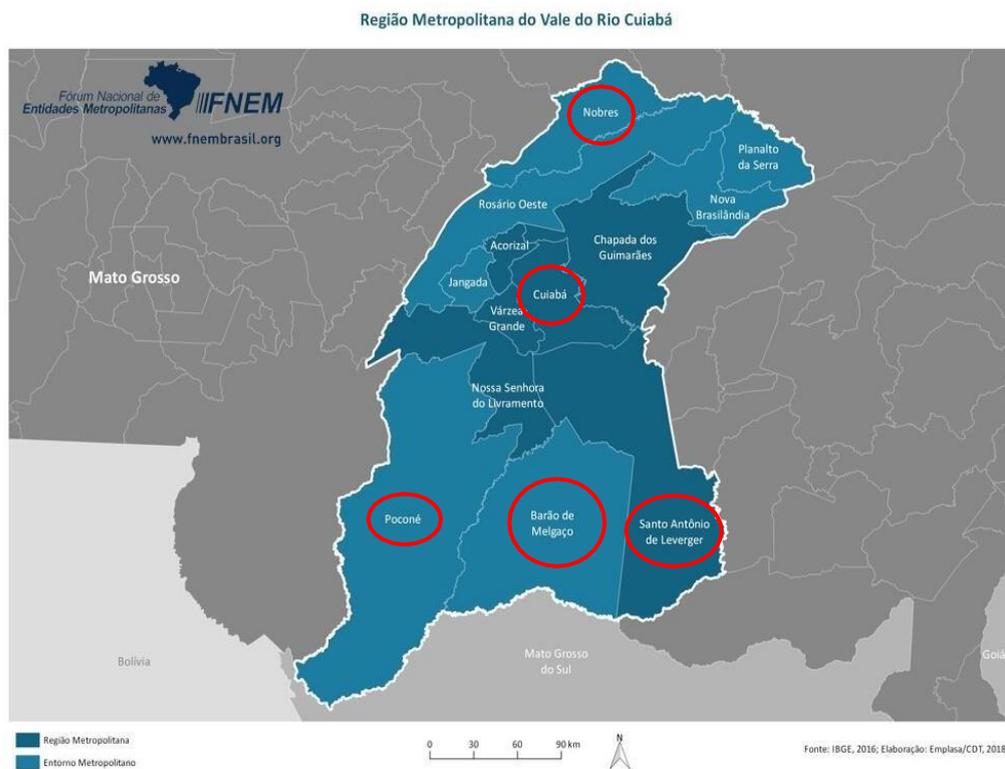
As capturas das aves foram executadas com redes de neblina em locais de mata fechada, mantidas abertas por um período de três a cinco dias em cada ponto de coleta. Adicionalmente, foram utilizados passaguás para captura das aves aquáticas nas regiões de baía ou em localidades onde estivessem presentes (Figura 3).

**Figura 1.** Localização da região Metropolitana do Vale do Rio Cuiabá, estado de Mato Grosso Brasil.



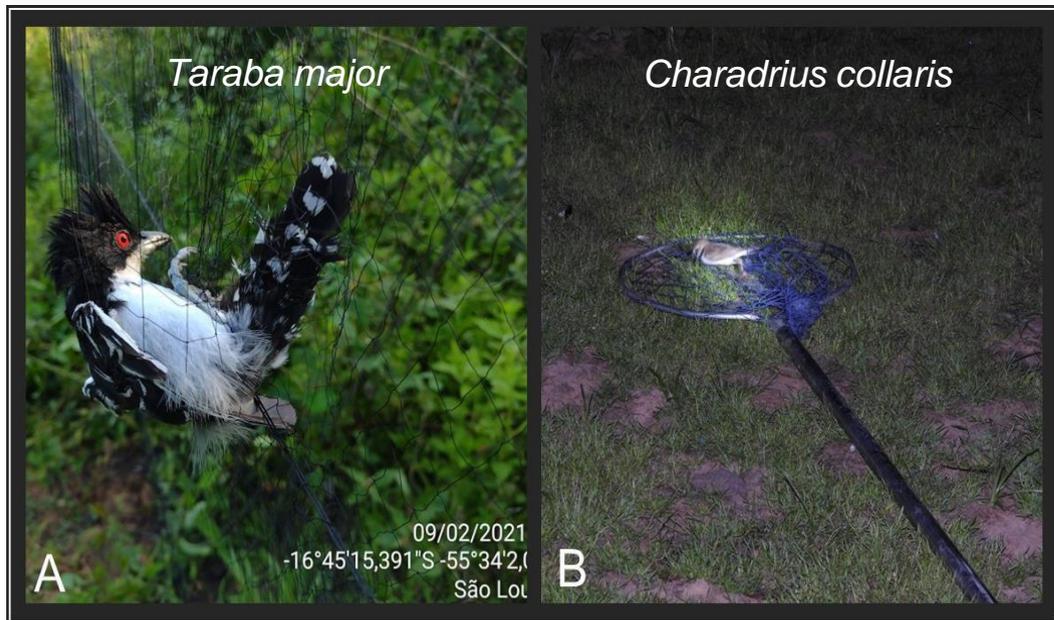
Fonte: IBGE (2016).

**Figura 2.** Municípios do estado de Mato Grosso, Brasil, onde foram realizadas as coletas de amostras nos anos de 2021-2023.



Fonte: IBGE (2016).

**Figura 3.** Aves capturadas através do método de rede de neblina (A) e passaguá (B).



Fonte: Imagem disponibilizada por Elaine R. Bueno. Laboratório de Ecologia de Aves UFMT (2022).

As amostras de interesse para pesquisa consistiram em swabs que foram coletados das regiões orotraqueais e cloacais. Essas amostras foram acondicionadas em microtubos contendo meio de transporte viral e preservadas em barris de nitrogênio líquido. Após a obtenção do material biológico, cada espécime foi identificado taxonomicamente, de acordo com a ordem, família, nome científico e popular. Posteriormente, as aves foram catalogadas para facilitar a classificação conforme seu nicho ecológico, levando em consideração a relação com o ambiente, hábitos, padrão de movimentação e dieta alimentar (Figura 4). Ao final de todo o procedimento, as aves eram soltas novamente em seu habitat.

Ao encerramento de cada campanha, todo o material obtido foi armazenado no ultrafreezer a uma temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ , localizado no Laboratório de Virologia e Rickettsioses da Universidade Federal de Mato Grosso, campus Cuiabá, até o início do processamento molecular.

**Figura 4.** Coleta de materiais (swabs mistos) e catalogação das espécies.



Fonte: Imagem disponibilizada por Elaine R. Bueno. Laboratório de Ecologia de Aves UFMT (2022).

### Análise molecular

As 1.138 amostras de swabs mistos (coletados das regiões orotraqueais e cloacais) dos espécimes capturados, foram submetidas a análise molecular no Laboratório de Virologia e Rickettsioses, Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (FAVET-UFMT), campus Cuiabá. As amostras que testaram positivas foram encaminhadas para o Laboratório de Pesquisa em vírus emergentes, no Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP).

As extrações dos materiais genéticos foram realizadas com o kit MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific), conforme o protocolo recomendado pelo fabricante para amostras de fluidos. Compreendendo um volume de 300µL de cada amostra, previamente armazenada em meio de transporte viral (VTM) a temperatura de -80°C.

Para a detecção dos agentes foram realizados ensaios TaqMan™ RT- qPCR (Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase) com o kit AgPath-ID™ One-step RT-PCR (Applied biosystems by Thermo Fisher Scientific), conforme

orientação da Rede Nacional de Vigilância de Vírus em Animais Silvestres PREVIR – MCTI (Projeto Rede de Vigilância de Vírus – Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação).

#### Detecção molecular do vírus influenza A

Para o ensaio TaqMan (RT-qPCR) do vírus Influenza A, foram utilizados um conjunto de iniciadores específicos para o gene da matriz (M) e uma sonda de hidrólise projetada para uma região conservada em todos os genes da matriz dos vírus influenza tipo A seguindo o proposto por SPACKMAN *et al.* (2002). Os iniciadores e a sonda de hidrólise são compostos pelas sequências de nucleotídeos detalhadas a seguir:

Iniciador senso (forward): AIV M+25 (5'-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3')

Iniciador antisenso (Reverse): AIV M-124 (5'-CCTGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTGCGC-3')

Sonda de hidrólise (probe): AIV M+64 (5'-FAM-TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ-1-3')

A amplificação do DNA para o vírus Influenza A foi realizada em um volume final de 25 µL, contendo 4 µL de molde de RNA, 5 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de tampão 2X RT-PCR, 1 µL mistura de Enzimas 25X RTPCR, 1 µL de primer forward (20 pmol/µL), 1 µL de primer reverse (20 pmol/µL) e 1 µL de sonda (6 pmol/µL) (AgPath-IDTM One Step RT-PCR Reagents). O protocolo de amplificação iniciou-se com transcrição reversa a 45°C por 10 minutos, desnaturação primária a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 52°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 10 segundos. As reações de amplificação foram realizadas em termocicladores de PCR em tempo real (QuantStudio 1 e 3), assim como a análise dos dados.

A amostra amplificada para o vírus influenza tipo A na TaqMan RT-qPCR foi submetida a um segundo protocolo de amplificação por RT-PCR convencional de acordo com o protocolo descrito por Zhou *et al.* (2009) e Hoffman *et al.* (2001). Foram utilizados os iniciadores direcionados para as 12 (MBT-uni12) (5-ACGCGTGATCAGCA AAAGCAGG) ou 13 (MBT-uni13) bases (5-ACGCGTGATCAGTAGAAACAAGG) conservadas nas extremidades de cada segmento de RNA de todos os vírus influenza A. Utilizou-se o kit de detecção *SuperScript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase* para

amplificação de todos os 08 segmentos do vírus influenza A (HOFFMAN *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2009).

#### Detecção molecular do vírus da doença de Newcastle

Para detecção do Avulavírus aviário sorotipo 1 foram realizados ensaios TaqMan utilizando iniciadores e sonda projetados para detectar sequências de uma região conservada do gene da proteína M (matriz), de acordo com o proposto por WISE *et al.* (2004). As sequências de nucleotídeos dos iniciadores e sonda utilizados foram:

Iniciador senso (forward): M+4100 (5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3')

Iniciador antisenso (reverse): M-4220 (5'-CCTGAGGAGAGGCAATTTGCTA-3')

Sonda (probe): M+4169 (5'-FAM-TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC – TAMRA 3')

A reação de amplificação para AAVv 1 continha um volume final de 25 µL, contendo 8 µL de molde de RNA, 2 µL de água livre de nuclease, 12,5 µL de Tampão 2X RT-PCR, 1 µL Mistura de Enzimas 25X RT-PCR, 0,5 µL de primer forward (20 pmol/µL), 0,5 µL de primer reverse (20 pmol/ µL) e 0,5 µL de sonda (6 pmol/ µL). O protocolo de amplificação iniciou-se com transcrição reversa a 45°C por 10 minutos, desnaturação primária a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 94°C por 10 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 10 seg. As reações foram realizadas nos termocicladores para PCR em tempo real QuantStudio 1 e 3, assim como a análise dos dados.

## Resultados

Foram identificadas taxonomicamente 18 ordens e 162 espécies do total de 1.138 aves silvestres capturadas, das quais foi possível realizar a coleta de swabs mistos. A partir desses dados de identificação, procedeu-se a classificação do status de ocorrência no Brasil, conforme descrito por Pacheco *et al.* (2021). Alcançou-se um total de 916 aves residentes/migratórias com evidências reprodutivas no país. Aves enquadradas nessa categoria realizam movimentos migratórios dentro do território nacional. Sessenta e seis indivíduos foram identificados como visitantes não reprodutivos oriundos do Norte (VI (N)), região Neártica, Caribe ou extremo norte da América do Sul, seis (6) como visitantes não reprodutivos oriundos de áreas a oeste do território brasileiro (VI (W)) e apenas uma (1) ave visitante não reprodutiva oriunda de áreas ao sul do Brasil (VI(S)), como Uruguai ou Chile (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação taxonômica em ordem das 1.138 aves silvestres amostradas nos anos de 2021 – 2023 e padrão de ocorrência no Brasil de acordo com Pacheco *et al.* (2021).

Ordem	Nº de indivíduos	Status de ocorrência no Brasil			
		Residente/Migratória <sup>BR</sup>	VI (N)	VI (W)	VI (S)
Accipitriformes	11	9	2	-	-
Anseriformes	151	151	-	-	-
Caprimulgiformes	6	8	-	-	-
Ciconiiformes	2	2	-	-	-
Charadriiformes	248	111	64	-	-
Columbiformes	90	80	-	-	-
Coraciiformes	8	8	-	-	-
Cuculiformes	5	5	-	-	-
Eurypygiformes	1	1	-	-	-
Galbuliformes	9	9	-	-	-
Gruiformes	4	4	-	-	-
Passeriformes	575	502	-	6	1
Pelecaniformes	7	7	-	-	-
Piciformes	13	12	-	-	-
Psittaciformes	3	2	-	-	-
Strigiformes	2	2	-	-	-
Suliformes	1	1	-	-	-
Trogoniformes	2	2	-	-	-
<b>Total</b>	<b>1.138</b>	<b>916</b>	<b>66</b>	<b>6</b>	<b>1</b>

**BR:** Residente ou migrante reprodutivo (com evidências de reprodução no país disponível).

**VI (N):** Visitante sazonal não reprodutivo, oriundo do Norte (Região Neártica, Caribe ou extremo norte da América do Sul).

**VI (W):** Áreas a oeste do território brasileiro (Peru, Bolívia; Paraguai e Argentina (sudoeste)).

**VI (S):** Áreas ao sul do território brasileiro (Uruguai e Chile)

Fonte: Elaborada pela autora (2023).

Ao total, foram capturadas 73 aves migratórias intercontinentais. Dessas, 64 pertenciam à ordem Charadriiformes, 07 Passeriformes, e apenas 02 da ordem Accipitriformes. De acordo com os dados de registros ornitológicos brasileiros, 68 das 73 espécies de aves migratórias possuem registro de ocorrência em todos os biomas brasileiros, podendo ser encontrados em praticamente todos os estados do País (Tabela 2) (WikiAves – A Enciclopédia de Aves do Brasil).

Tabela 2. Aves migratórias intercontinentais e registro de ocorrência no Brasil.

Ordem	Espécie	Número de indivíduos	Rotas migratórias	Registro de ocorrência no Brasil
Charadriiformes	<i>Actitis macularius</i> <sup>1</sup>	1	Oceano Atlântico; Amazônia central/Pantanal	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Calidris fuscicollis</i> <sup>1</sup>	5	Oceano Atlântico	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Calidris melanotos</i> <sup>1</sup>	24	Oceano Atlântico/Mississippi	Todos os biomas
Passeriformes	<i>Elaenia chilensis</i> <sup>3</sup>	1	Oceano Atlântico/Encosta leste dos Andes	Todos os biomas
Passeriformes	<i>Inezia inornata</i> <sup>2</sup>	5	Rota migratória não definida*	Amazônia, Cerrado, Pampa, Pantanal
Accipitriformes	<i>Pandion haliaetus</i> <sup>1</sup>	2	Oceano Atlântico/Amazônia central	Todos os biomas
Passeriformes	<i>Serpophaga subcristata</i> <sup>2</sup>	1	Rota migratória não definida**	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Tringa flavipes</i> <sup>1</sup>	13	Oceano Atlântico	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Tringa melanoleuca</i> <sup>1</sup>	3	Oceano Atlântico; Amazônia central/Pantanal	Todos os biomas
Charadriiformes	<i>Tringa solitaria</i> <sup>1</sup>	18	Oceano Atlântico/Mississippi	Todos os biomas

<sup>1</sup>VI (N): Visitante sazonal não reprodutivo, oriundo do Norte (Região Neártica, Caribe ou extremo norte da América do Sul).

<sup>2</sup>VI (W): Áreas a oeste do território brasileiro (Peru, Bolívia; Paraguai e Argentina (sudoeste)).

<sup>3</sup>VI (S): Áreas ao sul do território brasileiro (Uruguai e Chile)

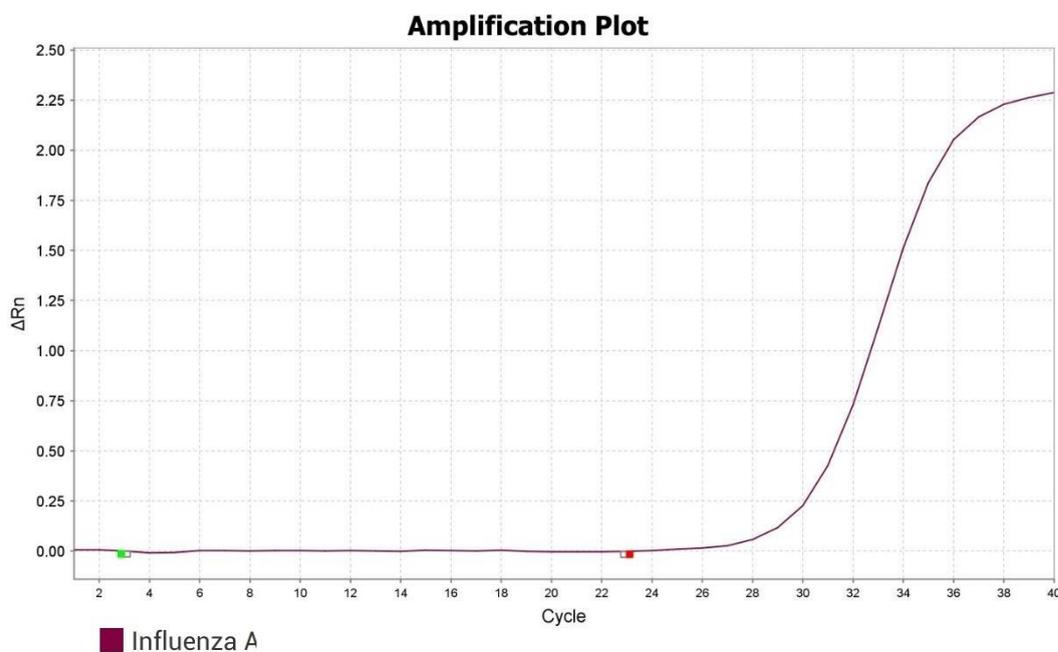
Fonte: Elaborada pela autora, de acordo com informações obtidas em: \*Somenzari et al. (2018); Serrano (2010); \*\* Nunes e Tomas (2008) e Wiki Aves.

Todas as 1.138 amostras de swabs mistos avaliadas por ensaios TaqMan RT – qPCR foram negativas para o vírus da doença de Newcastle, e 1.137 amostras também apresentaram resultado negativo para o vírus influenza A. Obteve-se resultado positivo para Alphainfluenzavirus em uma amostra proveniente de uma ave limícola da ordem Charadriiformes, espécie *Charadrius collaris* e popularmente conhecida como batuira-de-coleira (amostra MT 1403). Durante a triagem para identificação do espécime, foi possível obter alguns dados, como peso (29 gramas), idade (adulto), e o sexo não pode ser definido devido á espécie não apresentar dimorfismo sexual na plumagem. A ave também não apresentava sinal clínico no momento da coleta. A captura dessa ave foi realizada pelo método de busca ativa no dia 24 de agosto de 2023, na Baía de Chacororé, localizada no município de Barão

de Melgaço (MT).

A reação foi realizada em material extraído a partir de swab misto e apresentou Ct (Cycle threshold) no valor de 30 (Figura 5). De acordo com Spackman (2020), amostras com pico de amplificação menor que 40 devem ser consideradas positivas. Frente a esse resultado, optou-se por submeter amostras individuais de swab oral e cloacal dessa ave á extração de material genômico, como descrito anteriormente. Após a extração, ambas amostras foram submetidas a reação de RT-qPCR seguindo o mesmo protocolo utilizado para as amostras de swabs mistos. A partir do swab oral, a amplificação foi detectada no Ct de valor 26 (Figura 6). Já a amostra de swab cloacal apresentou aumento na curva de amplificação, mas que não alcançou o limiar do Ct (Figura 7).

**Figura 5.** Curva de amplificação da amostra positiva para o vírus influenza A na técnica de RT-qPCR.



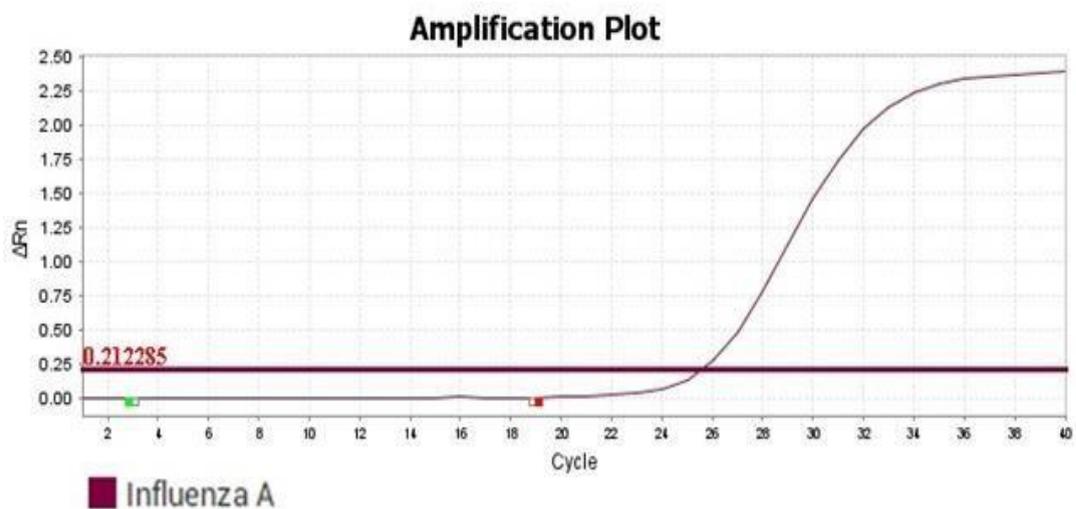
Fonte: Arquivo pessoal (2023).

**Figura 6.** Curva de amplificação da amostra de swab cloacal para o vírus Influenza A, na técnica de RT-qPCR.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2023).

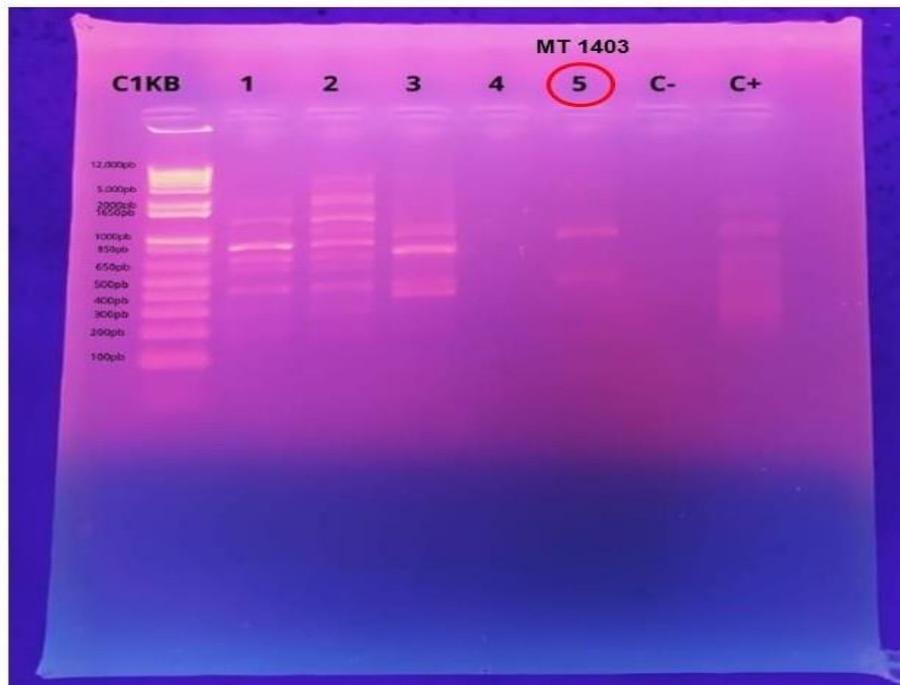
**Figura 7.** Curva de amplificação da amostra de swab oral para o vírus Influenza A, na técnica de RT-qPCR.



Fonte: Arquivo pessoal da autora (2023).

A amostra positiva foi submetida novamente a técnica de RT-qPCR em um segundo laboratório (ICB-UCP) seguindo o protocolo de amplificação descrito por Spackman *et al.* (2002), onde também testou positiva para vírus influenza A. Posteriormente, foi realizada uma amplificação multi-genômica de RT-PCR convencional, segundo Zhou *et al.* (2009), e a amostra apresentou amplificação de diferentes segmentos (Figura 8), muitos deles de peso molecular inespecífico. Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento genômico por meio da plataforma MinION-NSG, contudo, não foi possível a determinação genômica do Alphainfluenzavirus por este ensaio.

**Figura 8.** Eletroforese da amostra positiva na RT-qPCR para vírus influenza A (destacada em vermelho).



Fonte: Jansen de Araújo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo/USP (2024).

## DISCUSSÃO

No presente estudo, foi possível capturar 73 aves migratórias no pantanal do estado de Mato Grosso. Embora corresponda a aproximadamente 6% (73/1.138) do total de aves capturadas, do ponto de vista epidemiológico, a presença desses espécimes em território brasileiro é significativamente importante, dado que as aves silvestres migratórias compreendem as principais transportadoras biológicas dos AIVs

e NDVs em escala global, inclusive para regiões onde a circulação viral é incomum (BLAGODATSKI *et al.*, 2021; ULRAHMAN *et al.*, 2021).

Dos 1.138 swabs mistos avaliados, todos apresentaram resultado negativo na técnica molecular de RT-qPCR para o vírus da doença de Newcastle. Este resultado está em conformidade com estudos realizados no Pantanal mato-grossense por Bourscheid *et al.* (2020) e por Pinto *et al.* (2016) em aves domésticas e aves silvestres, respectivamente, nos quais também não foram encontradas evidências da circulação do NDV pela técnica de RT-qPCR no estado de Mato Grosso.

Em relação ao vírus influenza A, do total de 1.138 amostras, uma (MT 1403) apresentou resultado positivo em amostras de swab misto (orotraqueal + cloacal) e swab oral pelo método Taqman de Transcrição reversa seguida de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). A amostra de swab cloacal, por outro lado, não alcançou o limiar do Ct, e por isso, foi considerada não detectada. Este resultado sugere que no momento da captura desta ave a replicação viral ocorria apenas no sistema respiratório, com ausência ou eliminação não detectável de Alphainfluenzavirus por via fecal. Há pouco conhecimento sobre as taxas de replicação dos subtipos virais de AIV's em órgãos de aves silvestres. No entanto, é conhecido que a distribuição de receptores de ácido siálico (AS) varia consideravelmente entre as diferentes espécies, o que influencia diretamente o local preferencial de replicação viral e a taxa de eliminação do vírus, seja por via respiratória ou gastrointestinal (ZHAO; PU, 2022; CRIADO *et al.*, 2021). Corroborando com nosso trabalho, outros estudos também demonstram que em algumas espécies aviárias como galinhas (*Gallus gallus*), patos tufados (*Aythya fuligula*) e patos mergulhadores (*Mergus octosetaceus*), a replicação viral é principalmente observada no sistema respiratório superior, mostrando taxas de detecção superior em comparação com a via fecal (NILSSON *et al.*, 2023; VAN DEN BRAND *et al.*, 2018). Além disso, de acordo com Kuchipudi *et al.* (2021) as aves da ordem Charadriiformes apresentam abundância de receptores AS  $\alpha$ 2,6-Galactose e AS  $\alpha$ 2,3-Galactose no epitélio do trato respiratório, o que justifica a detecção viral positiva de amostras da região orotraqueal nesse estudo.

A amplificação dos segmentos do genoma da reação *endpoint* PCR não produziu amplificação desejada para o sequenciamento genômico, por isso, não foi possível determinar o subtipo envolvido na detecção. Esses resultados divergentes podem ser atribuídos a três fatores ou nas suas combinações. Primeiro, a quantidade

insuficiente de RNA viral presente na amostra para a amplificação dos segmentos genômicos, o que justifica sua detecção apenas pelo método de RT-qPCR, reconhecido por apresentar maior sensibilidade na detecção de baixos números de cópias de DNA/cDNA em comparação ao método convencional (CROVILLE *et al.*, 2018; ARTIKA *et al.*, 2022). Segundo, a degradação do RNA viral durante o transporte da amostra do estado de Mato Grosso para o estado de São Paulo, onde foram realizadas as técnicas de *endpoint* PCR e sequenciamento genético. Sabe-se que há maior suscetibilidade do ácido ribonucleico à degradação química e/ou física quando comparado ao ácido desoxirribonucleico. Considerando que a amostra foi transportada por um serviço de encomenda expressa e, embora tenha sido armazenada corretamente para o deslocamento, entende-se que ficou suscetível à variações de pH e temperatura. A alteração constante desses fatores influencia diretamente na degradação do material genético (BEGUM; JABEEN; RIZVI, 2023; CHHEDA *et al.*, 2023). Terceiro, a presença de sequências hospedeiras e bacterianas abundantes pode interferir na detecção do material genético-alvo quando este está em baixas quantidades na amostra submetida ao sequenciamento GNS (GORAICHUK *et al.*, 2024). Ainda em relação ao NGS, de acordo com IP *et al.* (2023), o dispositivo utilizado para o sequenciamento nessa pesquisa (Minlon da Oxford Nanopore Technology) produz maiores taxas de erros e menor sensibilidade quando comparados a outros sistemas de sequenciamento de nova geração.

A captura de aves migratórias da ordem Charadriiformes foi predominante (64/73), seguido de Passeriformes (7/73) e por último Acciptriformes (2/73). De acordo com os registros ornitológicos essas espécies identificadas podem ser encontradas em todos os biomas brasileiros, o que aumenta significativamente a chance de dispersão viral entre diferentes regiões do país (Pacheco *et al.*, 2021; Wiki Aves). De acordo com o MAPA (2023) já somam um total de 148 surtos de HPAI (H5N1) notificados no Brasil, onde as infecções predominam nas espécies aquáticas limícolas Trinta-réis-de-bando (*Thalasseus acutiflavus*) e Trinta-réis-real (*Thalasseus maximus*), também pertencentes à ordem Charadriiformes.

O material biológico de onde detectou-se a presença do vírus influenza A pertence a uma ave residente limícola da espécie *Charadrius collaris*, capturada na Baía de Chacororé um dos maiores corpos hídricos (lagoas) do Pantanal matogrossense, localizado no município de Barão de Melgaço. As baías que compõem a planície inundável do Pantanal são importantes regiões de escala para aves

migratórias, e a obtenção desse resultado confirma o que já levantado por Araújo *et al.* (2018) e BOURSCHEID *et al.* (2020) sobre a extrema importância no estudo de patógenos virais em regiões próximas a grandes planícies alagadas.

As aves residentes/migratórias (nacionais ou regionais) compreenderam o maior número de indivíduos capturados, predominando aves pertencentes a ordem Passeriformes (502/916). Apesar dessas aves não estarem diretamente relacionadas com a propagação dos vírus HPAI e o Vírus da Doença de Newcastle, o monitoramento de campo nessas populações se faz tão importante quanto a avaliação das aves com hábitos migratórios, levando em consideração que a principal via de transmissão de ambos agentes é a fecal-oral, e a contaminação ambiental com excrementos fecais de espécimes aquáticos é um potencial risco de contaminação para as aves residentes, principalmente as que habitam regiões próximas a rios e corpos d'água. Vale ressaltar que esses vírus são capazes de resistir por um período prolongado em áreas úmidas e matéria orgânica (RAHMAN; HABIB; SHABBIR, 2018; BLAGODATSKI *et al.*, 2021).

A detecção do vírus Influenza A na espécie residente *Charadrius collaris* nesse estudo ressalta a importância da realização de ensaios epidemiológicos no Pantanal mato-grossense e destaca a necessidade de uma compreensão mais aprofundada sobre o comportamento e ecologia da avifauna nacional. É essencial direcionar mais pesquisas para entender como esta espécie e outras aves residentes contribuem com a circulação de vírus influenza A no estado de Mato Grosso, bem como o nível de interação delas com a fauna doméstica e a espécie humana, especialmente frente à epidemia global de HPAI (H5N1) enfrentada no momento.

## **CONCLUSÃO**

Conclui-se no presente estudo que não há atividade do vírus da doença de Newcastle nas aves silvestres da região do pantanal mato-grossense e entorno. A detecção de um vírus Influenza A por meio do método de RT-qPCR em uma ave residente da espécie *Charadrius collaris* no estado de Mato Grosso é um achado significativo e inusitado que destaca a importância de investigações epidemiológicas nas regiões de Baías do Pantanal mato-grossense. Ainda há muitas lacunas a serem preenchidas quanto ao papel específico dessa espécie na circulação viral nessas áreas.

É crucial direcionar novos estudos para mais investigações de patógenos virais emergentes e reemergentes na avifauna nacional. Essas pesquisas são essenciais para

avaliar o risco epidemiológico nas interfaces de transbordamento entre a vida selvagem, pecuária e humana. Ao entendermos mais sobre a ecologia e o comportamento das aves, bem como sobre a dinâmica da transmissão viral, é possível desenvolver estratégias mais eficazes para a prevenção e o controle de doenças infecciosas que possam afetar tanto a saúde animal quanto a saúde pública.

## REFERÊNCIAS

ARAÚJO, A. C. *et al.* Incursion of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Clade 2.3.4.4b Virus, Brazil, 2023. **Emerging Infectious Diseases**, [S.L], v. 30, n. 3, p. 619–621, 01 mar. 2024. DOI: 10.3201/eid3003.231157

ARAÚJO, J. *et al.* Migratory birds in southern Brazil are a source of multiple avian influenza virus subtypes. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, [S.L], v. 12, n. 2, p. 220–231, 15 dez. 2018. DOI: 10.1111/irv.12519

ARTIKA, I. M.; DEWI, Y. P.; NAINGGOLAN, I. M.; SIREGAR, J. E.; ANTONJAYA, U. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. **Genes**, [S.L], v. 13, n. 12, p. 2387, 16 dez. 2022. DOI: 10.3390/genes13122387

BEGUM, S.; JABEEN, S.; RIZVI, S. A. H. The pattern of RNA integrity and the expression of housekeeping genes are influenced by sodium hypochlorite and ascorbic acid. **American Journal of Stem Cells**, v. 12, n. 1, p. 12–22, 25 fev. 2023. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10018005/>>. Acesso em: 11 set. 2023.

BLAGODATSKI, A. *et al.* Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. **Pathogens**, [S.L], v. 10, n. 5, p. 630, 01 mai. 2021. DOI: 10.3390/pathogens10050630

BODEWES, R.; KUIKEN, T. Changing Role of Wild Birds in the Epidemiology of Avian Influenza A Viruses. **Advances in Virus Research**, [S.L], v. 100, p. 279–307, 2018. Acesso em: 15 dez. 2020.

BOURSCHEID, C. L. P. R. *et al.* Surveillance of avian influenza and Newcastle disease viruses in backyard poultry raised near migratory bird sites in Mato Grosso state, Brazil. **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, [S.L], v. 39, n. 3, p. 907–922, 01 dez. 2020. DOI: 10.20506/rst.39.3.3187

CHHEDA, U.; PRADEEPAN, S.; ESPOSITO, E.; STREZSAK, S.; FERNANDEZ-DELGADO, O.; KRANZ, J. Factors affecting stability of RNA – temperature, length, concentration, pH, and buffering species. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S.L], n.113, v. 2, p. 377–385, Epub 30 nov. 2023. DOI: 10.1016/j.xphs.2023.11.023

CRIADO, M. F.; MORESCO, K. A.; STALLKNECHT, D. E.; SWAYNE, D. E. Low-pathogenicity influenza viruses replicate differently in laughing gulls and mallards. **Influenza and Other Respiratory Viruses**, [S.L], v. 15, n. 6, p. 701–706, 10 jun. 2021. DOI: 10.1111/irv.12878

CROVILLE, G. *et al.* Disclosing respiratory co-infections: a broad-range panel assay for avian respiratory pathogens on a nanofluidic PCR platform. **Avian Pathology**, [S.L], v. 47, n. 3, p. 253–260, 27 fev. 2018. DOI: 10.1080/03079457.2018.1430891

FLORES, E. D. *Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas*. 3. ed. Santa Maria, RS: Editora UFSM, 2017. cap. 30, p. 810-815.

GILBERTSON, B.; SUBBARAO, K. Mammalian infections with highly pathogenic avian influenza viruses renew concerns of pandemic potential. **Journal of Experimental Medicine**, [S.L], v. 220, n. 8, p. e20230447, 16 jun. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.20230447>. Acesso em: 02 de set. 2023.

GORAICHUK, I. V.; HARDEN, M.; SPACKMAN, E.; SUAREZ, D. L. The 28S rRNA RT-qPCR assay for host depletion evaluation to enhance avian virus detection in Illumina and Nanopore sequencing. **Frontiers in microbiology**, [S.L], v. 15, p. 1328987, 31 jan. 2024. PMID: 38351914

HICKS, J. T.; DIMITROV, K. M.; AFONSO, C. L.; RAMEY, A. M.; BAHL, J. Global phylogenetic analysis of avian paramyxovirus-1 provides evidence of inter-host transmission and intercontinental spatial diffusion. **BMC Evolutionary Biology**, [S.L], v. 19, n. 108, p. 1-15, 24 maio 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1431-2>. Acesso em 10 de set. 2023.

HILL, N. J. *et al.* Ecological divergence of wild birds drives avian influenza spillover and global spread. **PLOS Pathogens**, [S.L], v. 18, n. 5, p. e1010062, 19 mai. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010062>

HIRSCHINGER, J.; VERGNE, T.; CORRE, T.; HINGRAT, Y.; GUERIN, J. L.; LE LOC'H, G. Exposure assessment for avian influenza and Newcastle disease viruses from peridomestic wild birds in a conservation breeding site in the United Arab Emirates. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.L], v. 69, n. 4, p. 2361-2372, 01 ago. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.14253>. Acesso em 02 de set. 2023.

HOFFMANN, E.; STECH, J.; GUAN, Y.; WEBSTER, R. G.; PEREZ, D. R. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. **Archives of Virology**, [S.L], v. 146, n. 12, p. 2275–2289, 01 dez. 2001. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s007050170002>. Acesso em: 06 fev. 2024.

ICMBio - INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE, 2019. **Relatório de Rotas e Áreas de Concentração de Aves Migratórias no Brasil**, Cabedelo, PB: CEMAVE/ ICMBio. 2019. ISSN: 2446-9750, 3a Edição, 2019/2020. Disponível em: [https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/relatorios/relatorio\\_de\\_rotas\\_e\\_areas\\_de\\_concentracao\\_de\\_aves\\_migratorias\\_brasil\\_3edicao.pdf](https://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/relatorios/relatorio_de_rotas_e_areas_de_concentracao_de_aves_migratorias_brasil_3edicao.pdf). Acesso em: 05 de out. 2023.

IP, H. S.; UHM, S.; KILLIAN, M. L.; TORCHETTI, M. K. An Evaluation of Avian Influenza Virus Whole-Genome Sequencing Approaches Using Nanopore Technology. **Microorganisms**, [S.L], v. 11, n. 2, p. 529, 01 fev. 2023. DOI: 10.3390/microorganisms11020529

KUCHIPUDI, S. V. *et al.*, Sialic Acid Receptors: The Key to Solving the Enigma of Zoonotic Virus Spillover. **Viruses**, [S.L], v. 13, n. 2, p. 262, 01 fev. 2021. DOI: 10.3390/v13020262

LEGUIA, M. *et al.* Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru. **Nature Communications**, [S.L], v. 14, n. 1, p. 5489, 7 set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41182-0>. Acesso em: 20 de set. 2023.

LICKFETT, T. M.; CLARK, E.; GEHRING, T. M.; ALM, E. W. Detection of Influenza A viruses at migratory bird stopover sites in Michigan, USA. **Infection Ecology & Epidemiology**, [S.L], v. 8, n. 1, p. 1474709, jan. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20008686.2018.1474709>. Acesso em: 16 de out. 2023.

LYCETT, S. J. *et al.* Genesis and spread of multiple reassortants during the 2016/2017 H5 avian influenza epidemic in Eurasia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L], v. 117, n. 34, p. 20814–20825, 7 ago. 2020. DOI: 10.1073/pnas.2001813117

MARANDINO, A. *et al.* Spreading of the High-Pathogenicity Avian Influenza (H5N1) Virus of Clade 2.3.4.4b into Uruguay. **Viruses**, [S.L], v. 15, n. 9, p. 1906, 1 set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/v15091906>

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA (MAPA). Influenza Aviária. **Investigações de Síndrome Respiratória e Nervosa das Aves realizadas pelo Serviço Veterinário Oficial**, 2023. Disponível em: <https://mapa-indicadores.agricultura.gov.br/publico/extensions/SRN/SRN.html>. Acesso em: 13 de dez. 2023.

MOSAAD, Z. *et al.* Emergence of Highly Pathogenic Avian Influenza A Virus (H5N1) of Clade 2.3.4.4b in Egypt, 2021–2022. **Pathogens**, [S.L], v. 12, n. 1, p. 90–90, 05 jan. 2023. DOI: 10.3390/pathogens12010090

Nguyen, G. T. *et al.* Study of the underlying mechanisms and consequences of pathogenicity differences between two in vitro selected G1-H9N2 clones originating from a single isolate. **Veterinary Research**. [S.L], n. 50, v. 18, p. 1-12, 01 mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0635-1>

NILSSON, J. *et al.* Expression of influenza A virus glycan receptor candidates in mallard, chicken, and tufted duck. **Glycobiology**, [S.L], p. 1-14, 22 dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwad098>

NUNES, A.P.; TOMAS, W. M. Aves migratórias ocorrentes no Pantanal: Caracterização e Conservação, Embrapa, 2008. Publicação online. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/811658/1/DOC62.pdf>. Acesso em: 25 de jul. 2023.

Ono, J. M.; Lima, C. B.; Ribeiro, L. F. Doença de Newcastle. **Revista GETEC**, [S.L], v.10, n.25, p. 9-13, 23 fev. 2021. Disponível em: <https://revistas.fucamp.edu.br/index.php/getec/article/view/2326>, Acesso em: 10 de set. 2023.

PACHECO, J. F. *et al.* Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos – segunda edição. **Zenodo**. 26 jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.5138368>. Acesso em: 10 de jul. 2023.

PARDO-ROA, C. *et al.* Cross-species transmission and PB2 mammalian adaptations of highly pathogenic avian influenza A/H5N1 viruses in Chile. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, [S.L], 30 jun. 2023. DOI: 10.1101/2023.06.30.547205

PATER, A. A. *et al.* High throughput nanopore sequencing of SARS-CoV-2 viral genomes from patient samples. **Journal of Biological Methods**, [S.L], v. 8, n. COVID 19 Spec Iss, p. e155, 27 set. 2021. DOI: 10.14440/jbm.2021.360

PINTO, L. B. *et al.* Investigation of Influenza A, West Nile and Newcastle Disease Viruses in Birds from the Pantanal Wetlands of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, [S.L], v. 18, n. 2, p. 291–298, mai-jun. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0111>

QUICK, J. nCoV-2019 sequencing protocol v3 (LoCost). **Protocols.io**, 25 ago. 2020. DOI: [dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l6n26rgqe/v3](https://doi.org/10.17504/protocols.io.bp2l6n26rgqe/v3)

RAHMAN, A. -; HABIB, M.; SHABBIR, M. Z. Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) in Feral Birds and their Potential Role in Interspecies Transmission. **The Open Virology Journal**, [S.L], v. 12, n. 1, p. 52-68, 31 ago. 2018. DOI: 10.2174/1874357901812010052

RAHMAN, A. -; HABIB, M.; SHABBIR, M. Z. Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) in Feral Birds and their Potential Role in Interspecies Transmission. **The Open Virology Journal**, [S.L], v. 12, n. 1, p. 52-68, 31 ago. 2018. DOI: 10.2174/1874357901812010052

RAMEY, A. M. *et al.* Highly pathogenic avian influenza is an emerging disease threat to wild birds in North America. **The Journal of Wildlife Management**, [S.L], v. 86, n. 2, 11 jan. 2022. The Wildlife Society. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jwmg.22171>. Acesso em: 20 de set. 2023.

RECHT, J.; SCHUENEMANN, V. J.; SÁNCHEZ-VILLAGRA, M. R. Host Diversity and Origin of Zoonoses: The Ancient and the New. **Animals**, [S.L], v. 10, n. 9, p. 1-14, 17 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ani10091672>. Acesso em: 12 de set. 2023.

SERRANO, I. L. **Distribuição e conservação de aves migratórias neárticas da ordem Charadriiformes (famílias Charadriidae e Scolopacidae) no Brasil**. 2010. 193 p. Dissertação (Doutorado em Zoologia) - Museu Paraense Emílio Goeldi, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

SINGH, S.; SINHA, M.; KUMARI, V.; GUPTA, B. K.; ARIF, M. An Outlook on Migration of Birds and types of Geographical Migratory Patterns. **International Journal of Advancement in Life Sciences Research**, [S.L], v. 3, n. 4, p. 1–8, 31 out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.31632/ijalsr.20.v03i04.001>

SOMENZARI, M. *et al.* An overview of migratory birds in Brazil. **Papéis Avulsos de Zoologia**, [S.L], v. 58. p. 1-66, 20 fev. 2018. Disponível em:

<https://doi.org/10.11606/1807-0205/2018.58.03>. Acesso em: 12 de jul. 2023.

SPACKMAN, E. **Animal Influenza Virus: Methods and Protocols**. 3. ed. Athens, GA: Editora Humana Press, 2020. Cap. 8, p. 100-107.

Spackman, E. *et al.* Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L], v. 40, n. 9, p. 3256-3260, 01 set. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002>

TAMMIRANTA, N. *et al.* Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) virus infections in wild carnivores connected to mass mortalities of pheasants in Finland. **Infection, Genetics and Evolution**, [S.L], v. 111, p. 105423–105423, 01 jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2023.105423>

TIAN, J. *et al.* Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b Introduced by Wild Birds, China, 2021. *Emerging Infectious Diseases journal – CDC*, [S.L], v. 29, n. 7, p. 1367-1375, 2020. Disponível em: [https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/29/7/22-1149\\_article](https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/29/7/22-1149_article). Acesso em: 28 de set. 2023.

TROGU, T. *et al.* Survey on the Presence of Viruses of Economic and Zoonotic Importance in Avifauna in Northern Italy. **Microorganisms**, [S.L], v. 9, n. 9, p. 1-12, 15 set. 2021. DOI: [10.3390/microorganisms9091957](https://doi.org/10.3390/microorganisms9091957)

UL-RAHMAN, A.; ISHAQ, H. M.; RAZA, M. A.; SHABBIR, M. Z. Zoonotic potential of Newcastle disease virus: Old and novel perspectives related to public health. **Reviews in Medical Virology**, [S.L], v. 32, n. 1, p. e2246, 10 mai. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/rmv.2246>. Acesso em: 28 de nov. 2023.

VAN DEN BRAND, J. M. A. *et al.* Wild ducks excrete highly pathogenic avian influenza virus H5N8 (2014–2015) without clinical or pathological evidence of disease. **Emerging Microbes & Infections**, [S.L], v. 7, n. 1, p. 1–10, 18 abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0070-9>

VELKERS, F. C.; MANDERS, T. T. M.; VERNOOIJ, J. C. M.; STAHL, J.; SLATERUS, R.; STEGEMAN, J. A. Association of wild bird densities around poultry farms with the risk of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 outbreaks in the Netherlands, 2016. **Transboundary and Emerging Diseases**, [S.L], v. 68, n. 1, p. 76–87, 18 mai. 2020. DOI: [10.1111/tbed.13595](https://doi.org/10.1111/tbed.13595)

VENKATESAN, P. Avian influenza spillover into mammals. **The Lancet Microbe**, [S.L], v. 4, n. 7, p. 492, 26 mai. 2023. DOI: [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00173-8)

WELCH, C. N. *et al.* Genomic comparison of Newcastle disease viruses isolated in Nigeria between 2002 and 2015 reveals circulation of highly diverse genotypes and spillover into wild birds. **Archives of Virology**, [S.L], v. 164, n. 8, p. 2031–2047, 23 maio 2019. DOI: [10.1007/s00705-019-04288-9](https://doi.org/10.1007/s00705-019-04288-9)

WIKI AVES - A Enciclopédia das Aves do Brasil. Disponível em: [www.wikiaves.com.br](http://www.wikiaves.com.br).

Acesso em: 25 de jul. 2023.

Wise, M. G. *et al.* Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, [S.L], v. 42, n.1, p. 329-338, jan. 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.1.329-338.2004

ZHOU, B. *et al.* Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. **Journal of Virology**, [S.L], v. 83, n. 19, p. 10309–10313, out. 2009. DOI: 10.1128/JVI.01109-09

## 9 APÊNDICE B – CLASSIFICAÇÃO DA REVISTA



REVISTA  
OBSERVATORIO  
DE LA ECONOMÍA  
LATINOAMERICANA

ISSN 1696-8352  
revista@observatoriolatinoamericano.com

### Qualis Periódicos

\* Evento de Classificação:

CLASSIFICAÇÕES DE PERIÓDICOS QUADRIÊNIO 2017-2020 ▾

Área de Avaliação:

MEDICINA VETERINÁRIA ▾ +

ISSN:

Título:

Observatório de la economía latinoamericana

Classificação:

-- SELECCIONE -- ▾

### Periódicos

ISSN	Título	Área com publicação no quadriênio	Classificação	Área mãe
1696-8352	OBSERVATORIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA	MEDICINA VETERINÁRIA	A4	ADMINISTRAÇÃO PÚBLICA E DE EMPRESAS, CIÊNCIAS CONTÁBEIS E TURISMO

## 10 APÊNDICE C – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA  

[← Back to Submissions](#)

### Submit an Article

1. Start   2. Upload Submission   3. Enter Metadata   4. Confirmation   5. Next Steps

#### Submission complete

Thank you for your interest in publishing with OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA.

#### What Happens Next?

The journal has been notified of your submission, and you've been emailed a confirmation for your records. Once the editor has reviewed the submission, they will contact you.

For now, you can:

- [Review this submission](#)
- [Create a new submission](#)
- [Return to your dashboard](#)