

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Escola de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

Bruna Hermine de Campos

**SUSCEPTIBILIDADE DE QUATIS (*Nasua nasua*) DE VIDA LIVRE AO VÍRUS DA  
INFLUENZA A EM PARQUE URBANO DE BELO HORIZONTE**

BELO HORIZONTE

2022

Bruna Hermine de Campos

**SUSCEPTIBILIDADE DE QUATIS (*Nasua nasua*) DE VIDA LIVRE AO VÍRUS DA  
INFLUENZA A EM PARQUE URBANO DE BELO HORIZONTE**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Clínica e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

Coorientadora: Profª. Dra. Zélia Inês Portela Lobato

BELO HORIZONTE

2022

C198s

Campos, Bruna Hermine de, 1996-

Susceptibilidade de quatis (*Nasua nasua*) de vida livre ao vírus da influenza A em parque urbano de Belo Horizonte / Bruna Hermine de Campos. – 2022.  
103f.: il.

Orientador: Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

Coorientadora: Zélia Inês Portela Lobato

Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção do título de Mestre em Ciência animal.

Área de concentração: Clínica e cirurgia veterinárias

Bibliografia: f. 85 a 98.

Anexos: f. 100 a 103

Apêndice: f. 99.

1. Quati - Belo Horizonte - Teses - 2. Quati – Doenças – Teses - 3. Vírus da influenza – Teses – 4. Ciência animal – Teses – I. Carvalho, Marcelo Pires Nogueira de – II. Lobato, Zélia Inês Portela – III. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – IV. Título.

**CDD – 636.089 4**

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569  
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

BRUNA HERMINE DE CAMPOS

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Medicina e Cirurgia Veterinária.

Aprovado(a) em 25 de fevereiro de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Marcelo Pires Nogueira de Carvalho - Presidente - Orientador(a)

Dr.(a). Erica Azevedo Costa

Dr.(a). Daniel Ambrózio da Rocha Vilela



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Pires Nogueira de Carvalho, Professor do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Erica Azevedo Costa, Professora do Magistério Superior**, em 25/02/2022, às 12:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniel Ambrózio da Rocha Vilela, Usuário Externo**, em 25/02/2022, às 14:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1269090** e o código CRC **AE1F83EC**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais que sempre apoiaram as minhas escolhas, me ofereceram o suporte necessário e são compreensivos sempre que preciso.

À minha família que nunca deixou faltar amor e carinho, em especial agradeço à minha tia Consuelo e as minhas avós Vera e Marília (em memória), a quem ainda estou aprendendo a conviver com a saudade.

À minha família emprestada, em especial ao meu padrasto que sempre esteve presente e que tanto me ensina e apoia, a sua mãe, Osvaldina (em memória), obrigada pelo privilégio que me concedeu de ter três avós e que agora guardo em meu coração.

Ao Pedro por ser o meu melhor amigo, companheiro e parceiro de vida, obrigada por estar comigo durante esta jornada.

Aos meus sogros por todo carinho, estarem sempre disponíveis e compreenderem os desafios envolvidos nesta realização.

Ao professor Marcelo Carvalho pela orientação que estende além da academia, pela paciência durante esses anos em todos os meus processos de aprendizado e por proporcionar o desenvolvimento deste projeto.

À equipe do Projeto Quatis que esteve comigo em todas as etapas deste projeto, sempre com muito respeito e companheirismo, em especial agradeço a Nadja por ter sido mais do que uma companheira de campo, a Jéssica pela dedicação e amizade, a Giovanna pela sua dedicação e carinho e a Janaína pela disposição e parceria.

Agradeço também a todas as pessoas que já passaram pelo Projeto Quatis que compartilharam tanto conhecimento e tornaram possível as realizações atuais.

À equipe do ECOS UFMG que trouxe grandes contribuições pessoais e profissionais a este trabalho.

À equipe do GEAS UFMG que participou das atividades de campo, obrigada por me permitirem compartilhar e aprender com vocês.

À professora Zélia por acreditar e tornar este projeto possível, além de tanto conhecimento compartilhado.

À equipe do LPVA pela companhia diária e ensinamentos, em especial a professora Érica e a Grazielle por todo carinho e paciência durante esses anos, obrigada por me ajudarem a desenvolver este trabalho.

À professora Roselene pela orientação referente aos estudos anatomopatológicos com tanta excelência e também aos seus orientados em especial ao Marcelo e Camila que me acompanharam, ensinaram e se tornaram tão importantes.

Aos funcionários do Parque por nos acompanharem em todos os dias de campo, por tornarem nossos dias melhores com tantas conversas e conselhos e também pela segurança oferecida à nossa equipe em especial ao Kened, Dauri, Rodrigo e Wanderley.

À Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte pelo suporte de logística e equipamentos.

Aos funcionários da Escola de Veterinária que ajudam a tornar os dias melhores em especial ao André e Luiz pelas conversas de corredor e pela segurança oferecida nos momentos de retorno do campo e saída dos laboratórios pela noite.

Às professoras Fabíola e Camila pelas suas contribuições a esta pesquisa e pelos conselhos compartilhados.

Às minhas amigas que estiveram comigo em todos os momentos, me ajudando a manter os meus objetivos e tornando os dias mais leves, obrigada por tanto, em especial a Rossana, Thalita, Flávia e Isabelle.

Aos colegas de pós-graduação que compartilharam comigo os momentos de ansiedade e conquistas em especial a Salene, Daniel, André e ao Gustavo Canesso (também pela elaboração dos mapas deste trabalho).

À equipe da Zoovet e Clinivet que permitiram nos momentos necessários a conciliação do trabalho com os meus objetivos acadêmicos.

À equipe do Projeto Brumadinho pela contribuição com a minha formação profissional e pessoal, em especial ao Pedro e ao Mateus.

Ao Cetas-BH por contribuírem com esta pesquisa no acompanhamento de uma das fêmeas de quati.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EV-UFMG por proporcionar o desenvolvimento desta pesquisa nestes dois anos e oferecer o suporte acadêmico mesmo que a distância.

À CAPES pela bolsa de mestrado que me permitiu a dedicação integral para a finalização deste trabalho.

Aos quatis que tornaram possível e proporcionaram aprendizados únicos quanto aos animais da nossa fauna.

A vida é a arte do encontro,  
embora haja tanto desencontro pela vida.

Vinicius de Moraes

A todos os meus encontros e desencontros  
que direta ou indiretamente tornaram possível.

## RESUMO

Os quatis (*Nasua nasua*) são carnívoros membros da família Procyonidae e estão presentes em altas densidades em diversos centros urbanos. Possuem hábitos gregários e generalistas, são acometidos por doenças infecciosas e podem atuar como reservatórios assintomáticos de agentes patogênicos. Nas últimas duas décadas, a vida selvagem, originou aproximadamente 75% das doenças zoonóticas existentes. A influenza A é uma enfermidade de distribuição global, que infecta um amplo espectro de hospedeiros e ocorre anualmente de forma sazonal, causando epidemias. As aves aquáticas são consideradas o reservatório natural da doença e contribuem significativamente para a sua disseminação. A evolução dos vírus influenza (IAVs) está altamente associada à sua natureza genômica e a eventos de deriva e mudança antigênica. Os suínos (*Sus scrofa domesticus*) possuem um papel importante na mudança antigênica, uma vez que podem ser infectados por IAVs de aves e humanos devido a presença de receptores de ácidos siálicos  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6. De forma semelhante, trabalhos científicos descrevem que guaxinins (*Procyon lotor*), parentes próximos dos quatis, também possuem ambos os tipos de receptores de ácido siálico em seu sistema respiratório, portanto com potencial capacidade de serem coinfetados por IAVs de diferentes origens. A capacidade dos vírus da Influenza A em se disseminar periodicamente para espécies originalmente não hospedeiras apresenta uma ameaça à saúde animal e humana. Neste contexto, o presente projeto objetivou estudar a susceptibilidade da população de quatis (*Nasua nasua*) do Parque Municipal das Mangabeiras, Minas Gerais, à infecção por IAVs. Para isso, foram realizadas as análises de inibição da hemaglutinação, RT-PCR em tempo real e histoquímica de lectinas. Amostras de soro de quatis capturados nos anos de 2013, 2014, 2018, 2019 e 2021 foram analisadas para a pesquisa dos subtipos H1N1pdm09, H3N2 e H1N1 humano sazonal anterior ao H1N1pdm09. Os resultados demonstraram exposição constante da população de quatis aos subtipos virais estudados, em uma prevalência de 92,4% (134/145), assim como elevada titulação de anticorpos nas diferentes faixas etárias e gêneros. Ainda, na detecção direta do vírus, realizada a partir das amostras biológicas obtidas no ano de 2021, constatou-se a presença do RNA viral em 23,81% (15/63) dos animais estudados. A partir de cadáveres de quatis encontrados na região do parque, foram encontrados, no sistema respiratório, receptores de ácidos siálicos  $\alpha$ -2,6 e  $\alpha$ -2,3 em amostras teciduais de concha nasal, traqueia e pulmão. Os resultados sugerem a susceptibilidade de quatis aos subtipos de IAVs de diferentes origens, assim como a transmissão assintomática intraespecífica. Mais estudos são necessários para compreender a importância epidemiológica

dos quatis no ciclo de transmissão deste agente zoonótico e medidas de mitigação devem ser realizadas a fim de reduzir a exposição de quatis a agentes patogênicos de origem humana, minimizando a possibilidade de eventos de transbordamento viral.

**Palavras-chave:** zoonose; saúde pública; diagnóstico molecular; sorologia; H1N1pdm09; H3N2; H1N1; ácido siálico; vida selvagem

## ABSTRACT

Coatis (*Nasua nasua*) are carnivorous members of the Procyonidae family and are present in high densities in several urban centers. They have gregarious and generalist habits and may be affected by infectious diseases, acting as potential asymptomatic reservoirs of pathogenic agents. In the last two decades, wildlife has given rise to approximately 75% of existing zoonotic diseases. In this context, influenza A is a disease of global distribution that infects a wide spectrum of hosts and occurs annually on a seasonal basis, causing epidemics. Waterfowl are considered the natural reservoir of the disease and contribute significantly to its spread. The evolution of influenza viruses (IAVs) is highly associated with their genomic nature and antigenic drift and shift events. Pigs (*Sus scrofa domesticus*) play an important role in antigenic change, since they can be infected by IAVs from birds and humans due to the presence of  $\alpha$ -2,3 and  $\alpha$ -2,6 sialic acid receptors. In a similar way, studies describe that raccoons (*Procyon lotor*), phylogenetically close to coatis, also have both types of sialic acid receptors in their respiratory system, therefore can be potentially coinfecting by IAVs of different origins. The ability of IAVs to periodically spread to originally non-host species poses a threat to animal and human health. In this context, the present project aimed to study the susceptibility of the coatis population (*Nasua nasua*) from the Mangabeiras Municipal Park, Minas Gerais, to infection by IAVs. For this, hemagglutination inhibition analysis, real-time RT-PCR and lectin histochemistry techniques were performed. Serum samples from coatis captured in 2013, 2014, 2018, 2019 and 2021 were analyzed for H1N1pdm09, H3N2 and human H1N1 seasonal subtypes prior to H1N1pdm09. The results showed constant exposure of the coatis population to the viral subtypes studied, with a prevalence of 92.4% (134/145), as well as high antibody titers in different age groups and genders. Also, in the direct diagnosis of the virus, carried out from the biological samples obtained in 2021, presence of viral RNA in the oropharyngeal swab samples was found in 23.81% (15/63) of the animals. The  $\alpha$ -2,6 and  $\alpha$ -2,3 sialic acid receptors were detected in the respiratory system from coatis carcasses found in the park. The results suggest the susceptibility of coatis to IAV subtypes of different origins, as well as possible exposure to viruses in the park from the human population and possible asymptomatic intraspecific transmission. More studies should be carried out in order to understand the epidemiological importance of the species in the transmission cycle of this zoonotic agent. Management measures must be carried out in order to reduce the exposure of coatis to pathogens of human origin, minimizing the possibility of viral spillover events.

**Keywords:** zoonosis; public health; molecular diagnosis; phylogeny; serology; H1N1pdm09; H3N2; H1N1; sialic acid; wildlife

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Quati ( <i>Nasua nasua</i> ), Minas Gerais – 2021. Fonte: Augusto Gomes, 2021.....	25
Figura 2: Representação de uma partícula viral do vírus da Influenza A. Fonte: KRAMMER et al., 2018. ....	28
Figura 3: Representação da ocorrência de deslocamento antigênico e deriva antigênica no vírus da Influenza A. Fonte: KRAMMER et al., 2018.....	31
Figura 4: Distribuição cronológica das Pandemias mundiais de Influenza A. Fonte: KRAMMER et al., 2018.....	33
Figura 5: Ciclo de vida viral da Influenza A. Fonte: AMPOMAH; LIM, 2019.....	36
Figura 6: Tecidos respiratórios de guaxinim ( <i>Procyon lotor</i> ) corados com lectinas específicas para ácidos siálicos (SIAs) com ligações $\alpha 2,6$ e $\alpha 2,3$ . A) traqueia superior; B) traqueia inferior; C) brônquio; D) bronquíolo. As setas indicam o revestimento endotelial dos tecidos indicados. A coloração verde mostra uma reação com a lectina de <i>Sambucus nigra</i> marcada com isotiocianato de fluoresceína, que indica SIAs ligados à galactose por uma ligação $\alpha 2,6$ . A coloração vermelha mostra uma reação com lectina <i>Maackia amurensis</i> biotinizada (detectada com Alexa Fluor 594 - estreptavidina conjugada), que indica uma ligação SIA $\alpha 2,3$ . Os tecidos foram contrastados com dicloridrato de 4,6 -diamidino-2-fenilindol. Ampliação original 40x nas figuras A, B e D e 100x na figura C. Fonte: HALL et al., 2008. ....	41
Figura 7: Demonstração da ocupação urbana e mineração de ferro ao redor do Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais. ....	47
Figura 8: Quati ( <i>Nasua nasua</i> ) em lixeira do Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais. Fonte: Augusto Gomes, 2021.....	48
Figura 9: Quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) na região limítrofe do Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais. Fonte: Augusto Gomes, 2021.....	49
Figura 10: Distribuição dos pontos de colocação de armadilhas para a captura de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	50
Figura 11: Armadilha do tipo Tomahawk ® com desarme de pedal de dimensões de 70 cm x 35 cm x 40 cm. ....	51
Figura 12: Quati ( <i>Nasua nasua</i> ) macho sob anestesia após captura e identificação com brinco numerado de polipropileno.....	52
Figura 13: Punção venosa da veia jugular de quati ( <i>Nasua nasua</i> ).....	53
Figura 14: Coleta de <i>swab</i> de orofaringe em quati ( <i>Nasua nasua</i> ). ....	53

Figura 15: Avaliação de desgaste dentário em quati ( <i>Nasua nasua</i> ).....	54
Figura 16: Leitura do resultado da análise de Inibição da Hemaglutinação das amostras de soro coletados de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ). .....	57
Figura 17: Realização da extração de RNA com utilização do kit QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN, BR) a partir de amostras de <i>swabs</i> de orofaringe de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ). .....	58
Figura 18: Utilização do sistema QuantStudio 1 Real-Time PCR (THERMO FISHER, BR). 60	
Figura 19: Distribuição das amostras de soro de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ), por ano, testadas pela técnica de Inibição da Hemaglutinação. ....	66
Figura 20: Porcentagem de animais positivos na análise de HI para o subtipo H1N1pdm09 e coinfeção com H3N2, e amostras negativas nos anos de 2013, 2014, 2018 e 2019.....	66
Figura 21: Porcentagem de animais positivos na análise de HI para os subtipos, H1N1pdm09, H3N2 e H1N1hu sazonal assim como coinfeções e amostras negativas no ano de 2021. ....	67
Figura 22: Distribuição de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) positivos no teste de HI por subtipo, classe etária e gênero. *Associação significativa no teste exato de Fischer ( $p<0,05$ ) seguido de comparação de resíduos padronizados (Anexos 1 e 2).....	69
Figura 23: Distribuição de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) positivos no teste de HI para o subtipo H1N1pdm09 por ano e local de captura no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	70
Figura 24: Distribuição de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) positivos no teste de HI para o subtipo H1N1 humano sazonal por ano e local de captura, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	71
Figura 25: Distribuição de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) positivos no teste de HI para o subtipo H3N2 por ano e local de captura, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	71
Figura 26: Distribuição de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) positivos no teste de RT-PCR para IAV no ano de 2021 e locais de captura, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	73
Figura 27: A) Concha nasal de <i>Nasua nasua</i> (Q2). As setas indicam reação com a lectina <i>Maackia amurensis</i> (SIA $\alpha$ -2,3). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 10X. B) Concha nasal de <i>Nasua nasua</i> (Q4). As setas indicam reação com a lectina <i>Sambucus nigra</i> (SIA $\alpha$ -2,6). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 40X. ....	75

Figura 28: A) Traqueia de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Maackia amurensis* (SIA  $\alpha$ -2,3). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X. B) Traqueia de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Sambucus nigra* (SIA  $\alpha$ -2,6). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X. .... 75

Figura 29: A) Pulmão de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Maackia amurensis* (SIA  $\alpha$ -2,3). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X. B) Pulmão de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Sambucus nigra* (SIA  $\alpha$ -2,6). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X. .... 76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: H1N1pdm09, H1N1hu sazonal e H3N2 utilizados para o estabelecimento do título viral na reação de Hemaglutinação.....	55
Tabela 2: Composição do mix de reação.....	59
Tabela 3: Primers e probe utilizados na reação.....	59
Tabela 4: Condições de ciclagem.....	59
Tabela 5: Distribuição das frequências das amostras de soro do ano de 2013, em relação ao gênero e classe etária de quatis, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	63
Tabela 6: Distribuição das frequências das amostras de soro de quatis do ano de 2014, em relação ao gênero e classe etária, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	63
Tabela 7: Distribuição das frequências das amostras de soro de quatis do ano de 2018, em relação ao gênero e classe etária, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	63
Tabela 8: Distribuição das frequências das amostras de soro de quatis capturados no ano de 2019, em relação ao gênero e classe etária, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	64
Tabela 9: Distribuição das frequências de captura de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) entre os períodos chuvoso e seco de 2021, de acordo com o gênero e classe etária.....	64
Tabela 10: Distribuição de captura de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) entre os períodos chuvoso e seco de 2021, em relação ao local de captura no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.....	65
Tabela 11: Distribuição de frequência do subtipo H1N1pdm09 na população de quatis, em relação ao período do ano de 2021.....	68
Tabela 12: Distribuição de frequência do subtipo H3N2 na população de quatis, em relação ao período do ano de 2021.....	68
Tabela 13: Distribuição de frequência do subtipo H3N2 na população de quatis, em relação ao gênero.....	68
Tabela 14: Distribuição do escore de positividade sorológica para os subtipos da Influenza A H1N1 pdm09, H1N1hu sazonal de H3N2 entre os quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) recapturados no ano de 2021.....	69

Tabela 15: Informações referentes às amostras positivas para IAV na análise de qRT-PCR, 2021.....	72
Tabela 16: Presença de receptores $\alpha$ -2,3 e $\alpha$ -2,6 em tecidos de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) analisados pela técnica de imuno-histoquímica de lectinas com o uso de <i>Sambucus nigra</i> e <i>Maackia amurensis</i> .....	74

## APÊNDICE

Apêndice 1: Distribuição de frequência do subtipo H3N2 na população de quatis, em relação a classe etária.....	99
Apêndice 2: Distribuição de frequência do subtipo H1N1pdm09, na população de quatis em relação a classe etária. ....	99

## ANEXO

Anexo 1: Licença Sisbio utilizada para a realização das campanhas de captura e coleta de amostras biológicas de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) no Parque Municipal das Mangabeiras no ano de 2021. ....	100
Anexo 2: Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG para a realização das campanhas de captura e coleta de amostras biológicas de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) no Parque Municipal das Mangabeiras, no ano de 2021. ....	101
Anexo 3: Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) das amostras biológicas coletadas de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) no Parque Municipal das Mangabeiras.....	102
Anexo 4: Continuação do cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) das amostras biológicas coletadas de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) no Parque Municipal das Mangabeiras. ....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEUA/UFMG	Comissão de Ética no Uso Animais da Universidade Federal de Minas Gerais
CPV-2	Parvovírus Canino tipo 2
CPV-2a	Parvovírus Canino tipo 2a
Ct	<i>Cycle threshold</i> (Limite de ciclo)
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay</i> (Ensaio de Imunoabsorção Enzimático)
FPV	Vírus da Panleucopenia Felina
H1N1hu sazonal	Vírus H1N1 humano sazonal
H1N1pdm09	Vírus H1N1 pandêmico de 2009
HA	Hemaglutinação
HA	Hemaglutinina
HA1	Subunidade 1 da Hemaglutinina
HA2	Subunidade 2 da Hemaglutinina
HI	Inibição da Hemaglutinação
HPAI	<i>Highly Pathogenic Avian Influenza</i> (Influenza Aviária Altamente Patogênica)
IAV	Vírus da Influenza A
IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
IV	Vírus Influenza
LPAI	<i>Low Pathogenic Avian Influenza</i> (Influenza Aviária de Baixa Patogenicidade)
M1	Proteína de Matriz 1
M2	Proteína de Matriz 2

MAA	<i>Maackia amurensis</i> aglutinina
NA	Neuraminidase
NEP	Proteína de exportação nuclear
NLS	Sinais de localização nuclear
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2	Proteína não estrutural 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PA	Proteína ácida da polimerase
PB1	Proteína básica da polimerase 1
PB2	Proteína básica da polimerase 2
PBS	Solução de salina tamponada
PqM	Parque Municipal das Mangabeiras
qRT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo real
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia de Polimerase
SIA	Ácido siálico
Sisbio	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético
SNI	<i>Sambucus nigra</i>
TST	Teste tuberculínico
UHA	Unidade Hemaglutinante
vRNP	Complexo de ribonucleoproteína viral

## SUMÁRIO

1	Introdução.....	22
2	Revisão de Literatura.....	24
2.1	Aspectos naturais da espécie <i>Nasua nasua</i> .....	24
2.2	Susceptibilidade de quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) a agentes patogênicos.....	26
2.3	Influenza A.....	27
2.3.1	Etiologia.....	27
2.3.2	Epidemiologia.....	30
2.3.3	Histórico.....	32
2.3.4	Patogenicidade.....	34
2.3.5	Receptores de Ácido Siálico.....	37
2.3.6	Influenza em mesopredadores.....	39
2.3.7	Diagnóstico.....	42
2.3.8	Controle e prevenção.....	44
3	Objetivos.....	46
3.1	Objetivo geral.....	46
3.2	Objetivos específicos.....	46
4	Material e métodos.....	47
4.1	Local de estudo.....	47
4.2	Licenças.....	49
4.3	Captura dos animais.....	49
4.3.1	Coleta de amostras biológicas.....	52
4.4	Necropsia.....	54
4.5	Análises laboratoriais no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal EV-UFMG.....	55
4.5.1	Hemaglutinação (HA).....	55
4.5.2	Inibição da Hemaglutinação (HI).....	55
4.5.3	Extração de RNA.....	57
4.5.4	RT-PCR em tempo real.....	58
4.6	Análises laboratoriais realizadas na Unidade de Histopatologia e IHQ do MULTILAB da EV-UFMG.....	60
4.6.1	Histopatologia.....	60
4.6.2	Imuno-histoquímica de lectinas.....	60
4.7	Análise estatística.....	62
5	Resultados.....	63
5.1	Animais capturados.....	63
5.1.1	Avaliação clínica.....	65
5.2	Reação de Inibição da Hemaglutinação.....	65
5.3	RT-PCR em tempo real.....	72
5.4	Necropsia.....	73
5.5	Histopatologia.....	74
5.6	Imuno-histoquímica de lectinas.....	74
6	Discussão.....	77
7	Considerações finais.....	84
8	Referências bibliográficas.....	85
9	Apêndice.....	99

10 Anexos.....	100
----------------	-----

## 1 INTRODUÇÃO

Áreas naturais com grande biodiversidade vegetal podem ser encontradas no âmbito urbano e no entorno de comunidades densamente povoadas. Em geral, essas áreas são utilizadas pela população como zonas de recreação, desenvolvimento sociocultural, educação ambiental e ecoturismo (MILLER, 1997). Um consenso na literatura é que parques urbanos são considerados estrategicamente importantes na promoção da qualidade de vida das pessoas e das sociedades em crescente urbanização (ULRICH, 1984; KAPLAN, 1985). Assim, a gestão correta e a conservação de parques urbanos se revelam como significativa estratégia para uma política efetiva do projeto urbano e da saúde pública (SZEREMETA; ZANNIN, 2013).

A grande diversidade da fauna presente no meio urbano, favorecida pela presença dos parques urbanos pode ter um impacto significativo e positivo sobre a educação da população e assim, indiretamente, facilitar a preservação da biodiversidade em ecossistemas naturais (SAVARD et al., 2000). Porém, a perturbação antropogênica da paisagem e as mudanças climáticas estão alterando maciçamente a distribuição das espécies e as relações ecológicas, resultando de maneira geral em prejuízos para a fauna silvestre (BRAWN et al., 2001; THOMPSON, 2013).

Os desafios impostos pelos diferentes ambientes existentes no meio urbano fazem com que alguns grupos, como espécies generalistas, que possuem alta plasticidade alimentar consigam se adaptar com mais facilidade (LIM; SODHI, 2004). Essas espécies, no entanto, podem compartilhar agentes infecciosos importantes para a saúde humana e animal, que podem ser os responsáveis pela emergência ou reemergência de doenças infecciosas (ALLISON et al., 2014). Neste contexto, um exemplo de doença é a parvovirose, provocada pelo parvovírus canino tipo 2 (CPV-2), que surgiu em meados da década de 1970 como uma variante do vírus da panleucopenia felina (FPV). Após adquirir mutações, este vírus se adaptou ao hospedeiro canino causando uma infecção pandêmica em cães ao redor do mundo, que nos anos seguintes foi substituído por uma nova variante altamente virulenta, o CPV-2a (BUONAVOGLIA et al., 2001; HOELZER; PARRISH, 2010). Carnívoros selvagens, como o guaxinim (*Procyon lotor*), um membro da família Procyonidae, foram importantes hospedeiros nesta evolução (ALLISON et al., 2012).

Entre os patógenos humanos conhecidos, 61% são zoonóticos e aproximadamente 75% das doenças que surgiram nas últimas duas décadas apresentaram sua origem na vida selvagem (WOOLHOUSE; TAYLOR, 2001).

A Influenza A é uma enfermidade de caráter zoonótico e distribuição global, sendo as aves silvestres aquáticas consideradas o reservatório natural para todos os subtipos virais (OLSEN et al., 2006; TAUBENBERGER; MORENS, 2009). A natureza genômica dos IAVs favorece eventos de mudança antigênica, de modo que se um vírus aviário de alta patogenicidade sofrer mutação e transpassar a barreira entre espécies, as novas variantes podem se tornar a causa de uma nova pandemia (SUZUKI, 2005).

Os suínos possuem um papel importante em eventos de transbordamento viral na epidemiologia da Influenza, por apresentarem receptores para os vírus de origem aviária e humana, são considerados “recipientes de mistura” para o agente (SHAO et al., 2017). A mais recente pandemia humana de Influenza ocorreu em 2009 devido a um rearranjo do vírus influenza A H1N1 com uma composição genética de segmentos genômicos de origem do vírus suíno triplo rearranjado da América do Norte e também do vírus suíno tipo aviário da Eurásia (GARTEN et al., 2009).

Infecções pelos vírus da influenza A têm sido frequentemente detectadas em espécies de mamíferos selvagens e o espectro de hospedeiros continua se expandindo (KRAMMER et al., 2018). Dentre estas espécies, os guaxinins, possuem potencial importância na epidemiologia, visto que evidências científicas demonstram a capacidade de guaxinins atuarem como dispersores do vírus no meio ambiente, e de serem coinfectados por vírus de origem aviária e humana, assim como os suínos (HALL et al., 2008).

A ampla distribuição geográfica de espécies mesopredadoras como os quatis (*Nasua nasua*) e guaxinins (*Procyon lotor*) e seus hábitos alimentares pouco seletivos, permitem a adaptação destas espécies ao ambiente urbano, promovendo maior proximidade e contato com humanos, animais domésticos e sinantrópicos (KOWALSKI et al., 2015). A possibilidade dessas espécies serem susceptíveis a infecções pelo vírus da influenza e disseminarem o vírus em quantidades consideráveis no ambiente, pode representar um risco para a saúde humana e animal (VAN DALEN et al., 2009). Essa situação demonstra a complexidade da ecologia da influenza e os papéis potencialmente importantes e negligenciados da vida selvagem peridoméstica nos ciclos de transmissão (HALL et al., 2008). Dessa forma, o presente projeto objetivou estudar a susceptibilidade de quatis (*Nasua nasua*) ao vírus da Influenza A em um parque urbano de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos naturais da espécie *Nasua nasua*

Os quatis (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766) são carnívoros de médio porte, classificados como a décima quinta espécie de mamífero mais abundante em florestas neotropicais, sendo enquadrados na categoria de “ampla distribuição geográfica e alta densidade” (DOBSON; YU, 1993). Globalmente avaliados com o estado de conservação Menos Preocupante (LC) pela IUCN (EMMONS; HELGEN, 2016).

O gênero *Nasua* pertence à família Procyonidae e à ordem Carnivora, sendo reconhecidas duas espécies: *Nasua narica* (quati-de-nariz-branco) e *Nasua nasua* (quati-de-cauda-anelada), ambas restritas ao continente Americano (DECKER, 1991; EISENBERG; REDFORD, 1999). As duas espécies apresentam semelhanças anatômicas, biológicas, ecológicas e sociocomportamentais (GOMPPER, 1995; GOMPPER; DECKER, 1998). Apesar da ampla distribuição geográfica pela América do Sul, ocorrendo desde a Colômbia e Venezuela até norte do Uruguai e Argentina, a espécie *Nasua nasua* ainda é pouco estudada, visto que a maioria dos estudos sobre quatis baseiam-se na espécie *N. narica* (América Central e Sul da América do Norte) (BEISIEGEL, 2001).

A denominação popular “coati” deriva do tupi *cua* – cintura e *tim* – nariz, o que, provavelmente, refere-se à maneira como os animais dormem, encostando o nariz na região do abdômen (KAUFMANN, 1962). Possuem um longo nariz móvel, cuja cor varia entre o cinza e o marrom. A cauda apresenta um padrão anelado, resultado da intercalação de faixas de pelos mais claros e escuros. As patas geralmente são marrons ou negras, com garras longas e afiadas (Figura 1) (GOMPPER, 1995; PINE, 1999; EISENBERG; REDFORD, 1999).



**Figura 1:** Quati (*Nasua nasua*), Minas Gerais – 2021. Fonte: Augusto Gomes, 2021.

Presentes preferencialmente em ambientes florestados, os quatis possuem dieta generalista composta por invertebrados, frutos e pequenos vertebrados (GOMPPER, 1995; GOMPPER; DECKER, 1998; NAKANO-OLIVEIRA, 2002; TROVATI, 2004; ALVES-COSTA, 1998). São animais de hábitos gregários, formam bandos de fêmeas e jovens de ambos os sexos compostos por 30 ou mais indivíduos (CRESPO, 1982; SCHALLER, 1983; PINE, 1999). Machos adultos já foram observados acompanhando bandos ao longo do ano, apesar de serem considerados solitários e se unirem aos bandos somente no período de acasalamento (ROCHA; SEKIANA, 2006; COSTA; MAURO, 2009).

Os quatis realizam papéis únicos que não podem ser preenchidos por carnívoros de topo (EMMONS; HELGEN, 2016). Alterações na sua densidade populacional podem influenciar a regeneração florestal devido ao seu papel na dispersão de sementes, bem como o seu potencial impacto nas populações de suas presas (ALVES-COSTA, 1998).

A espécie compõe a dieta de grandes felinos e o aumento na densidade populacional de quatis tem sido atribuída à redução populacional de seus predadores (TERBORGH et al., 1997; GOMPPER; DECKER, 1998; WRIGHT et al., 2000; HASS; VALENZUELA, 2002). Em condições favoráveis são capazes de gerar um grande número de descendentes. As fêmeas se reproduzem com poucos anos de vida, cerca de dois anos, e as ninhadas são relativamente grandes, variando de dois a sete filhotes (ROCHA; SEKIANA, 2006; OLIFIERS, 2010). Essas condições propiciam a ocorrência de altas densidades, principalmente em áreas urbanizadas, onde, devido à sua plasticidade alimentar, consomem os mais variados itens, incluindo lixo

urbano (NAKANO-OLIVEIRA, 2002; COSTA, 2003; GATTI et al., 2006; HEMETRIO, 2011).

## 2.2 Susceptibilidade de quatis (*Nasua nasua*) a agentes patogênicos

A presença de quatis (*Nasua nasua*) em altas densidades populacionais, em ambientes urbanos, eleva as taxas de contato com a população humana e de animais domésticos, favorecendo a transmissão de patógenos interespecíficos como também a ocorrência de conflitos (MARZLUFF, 2001; PRANGE; GEHRT, 2003).

Os quatis são susceptíveis a uma diversidade de patógenos, atuam como reservatórios assintomáticos, assim como podem sofrer com os agravos de doenças infecciosas. Estudos no Brasil demonstraram a exposição de quatis a patógenos zoonóticos assim como o desenvolvimento de doenças decorrentes da presença de agentes importantes para a conservação (TRAVASSOS, 1917; HERRERA et al., 2008; MURAKAMI et al., 2012; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2016; DA SILVA et al., 2018; COSTA et al., 2018; BUCAFUSCO et al., 2019; ALMEIDA et al., 2020; MICHELAZZO et al., 2020; SPERA et al., 2020; LENT; FREITAS, 1938; MACHADO FILHO, 1950; SCHMIDT, 1972; TRAVASSOS, 1926; VIEIRA et al. 2008).

Em uma área limítrofe entre paisagem urbana e selvagem no estado de Minas Gerais, Costa et al. (2018) descreveu a exposição de quatis e cães domésticos à mesma linhagem do vírus da Vaccinia, constatando o compartilhamento de patógenos entre animais domésticos e quatis. Nos quatis desta mesma área foi relatada a presença de uma nova espécie de *Angiostrongylus* e de cepas de *Clostridium difficile* e *Clostridium perfringens*, incluindo os ribotipos comumente relatados na infecção por *C. difficile* em humanos (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2016; ALMEIDA et al., 2020). Outros estudos descrevem a presença de *Hepatozoon* sp., *Rickettsia* spp. e *Mycoplasma* sp. em amostras de sangue e ectoparasitos de *Nasua nasua* (DA SILVA et al., 2018). No pantanal, os quatis são considerados hospedeiros naturais de *Trypanosoma cruzi* (HERRERA et al., 2008).

Diversos parasitos intestinais de mamíferos silvestres brasileiros já foram relatados em quatis, entre eles algumas espécies de acantocéfalos incluindo *Oncicola luehei*, nos estados do Pará, São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, e algumas espécies de *Neoncospora potosi* em Foz do Iguaçu e Paraná (TRAVASSOS, 1917; LENT; FREITAS, 1938;

MACHADO, 1950; SCHMIDT, 1972; TRAVASSOS, 1926, VIEIRA et al., 2008; MORAES MFD, 2016).

Em relato descrito por Murakami e colaboradores (2012), um quati pertencente a um centro de triagem de animais silvestres apresentou lesões pulmonares compatíveis com tuberculose, levantando-se à suspeita de um possível quadro causado por espécies de micobactérias. Ainda neste mesmo centro, outros quatro quatis com suspeita de infecção por micobactérias foram sedados para a realização de testes tuberculínicos (TSTs), que apresentaram resultado positivo. Recentemente, estudos relataram a presença e desenvolvimento de sinais clínicos associados à infecção por morbilvírus canino e parvovírus canino em quatis, demonstrando também a susceptibilidade desta espécie à infecção por protoparvovírus carnívoro tipo 1 e sua importância como reservatório e fonte de infecção assintomática para outros animais (BUCAFUSCO et al., 2019; MICHELAZZO et al., 2020; SPERA et al., 2020).

Os hábitos generalistas, a distribuição geográfica, assim como a susceptibilidade a patógenos de diferentes espécies torna os quatis espécies indicadoras para a presença e circulação de patógenos em determinada região, podendo ser utilizados como animais sentinelas na monitoração da saúde animal, humana e ambiental (BURGER et al., 2002; BISCHOF; ROGERS, 2005).

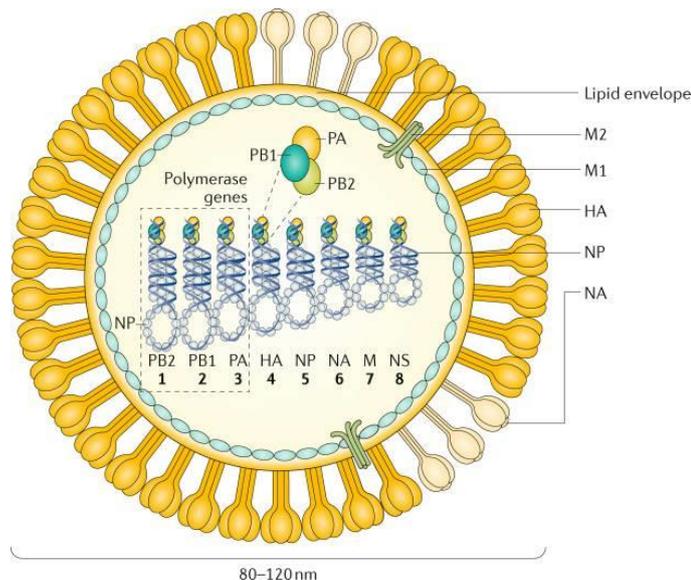
## **2.3 Influenza A**

### **2.3.1 Etiologia**

Os vírus da influenza pertencem à família Orthomyxoviridae (Orthos: original, verdadeiro; myxa:muco) a qual é composta por seis gêneros: Influenzavirus A, Influenzavirus B, Influenzavirus C, Isavirus, Quaranjavírus e Thogotovirus (ICTV, 2020)

O gênero *Influenzavirus* compreende os vírus Influenza (IV), que são considerados importantes patógenos humanos. Os vírus do gênero *Influenzavirus A* (IAV) possuem genoma constituído por oito segmentos de RNA em fita simples de sentido negativo, que codificam até dez proteínas virais. São pleomórficos, envelopados e apresentam sensibilidade ao calor, à solventes lipídicos e ao pH ácido (HORIMOTO; KAWAOKA, 2005; TAUBENBERGER; KASH, 2010; SANTOS et al., 2015).

Cada segmento genômico do vírus da Influenza codifica pelo menos uma proteína estrutural: proteína básica da polimerase 2 (PB2, segmento 1), proteína básica da polimerase 1 (PB1, segmento 2), proteína ácida da polimerase (PA, segmento 3), hemaglutinina (HA, segmento 4), nucleoproteína (NP, segmento 5), neuraminidase (NA, segmento 6), proteínas de matriz (M1 e M2, segmento 7) e proteínas não estruturais (NS1 e NS2) e a proteína de exportação nuclear (NEP, segmento 8) (SHAW; PALESE, 2013) (Figura 2).



**Figura 2:** Representação de uma partícula viral do vírus da Influenza A. Fonte: KRAMMER et al., 2018.

As glicoproteínas transmembranares virais, hemaglutinina e neuraminidase, compõem o envelope viral (HA, ~80% e NA, ~17%). A proteína HA forma um trímero, que se projeta aproximadamente 13,5 nm da superfície viral e tem formato de bastonete, enquanto a proteína NA forma um tetrâmero com formato de cogumelo (WILSON et al., 1981; SKEHEL; WILEY, 2000; SHAW; PALESE, 2013). Estas desempenham papéis complementares no ciclo de vida do vírus influenza. Estudos experimentais sugerem que um bom equilíbrio entre a atividade de HA e NA deve ser alcançado para a infecção viral produtiva (WAGNER et al., 2000).

A hemaglutinina demonstra importância na patogenicidade viral e é um fator determinante no tropismo do vírus a determinados tecidos. A clivagem da HA em subunidades HA1 e HA2 é fator fundamental para que a partícula viral se torne infecciosa. Essa clivagem é realizada por proteases celulares as quais são abundantes nas vias respiratórias (BROOKS et al., 2014). Através do sítio de ligação da subunidade HA1, ácidos siálicos presentes na membrana das células hospedeiras são reconhecidos e assim a hemaglutinina é responsável pela

ligação do vírion. A extremidade HA2 é essencial para que ocorra a fusão do vírion com a membrana celular (SANTOS et al., 2015).

A neuraminidase facilita a liberação da progênie viral da célula infectada através da remoção do ácido siálico dos gliconjugados. Também impede a agregação das novas partículas virais à célula hospedeira removendo os resíduos de ácido siálico das glicoproteínas virais e auxilia no acesso dos vírus às células epiteliais pela degradação de mucinas no trato respiratório (NICHOLSON et al., 2003; (BROOKS et al., 2014). Tanto a HA como a NA são os principais alvos da resposta imune humoral contra os vírus Influenza A, porém a neuraminidase tem sido um alvo significativo para a terapia antiviral, como exemplo os fármacos oseltamivir e zanamivir (TAUBENBERGER; KASH, 2010; GAYMARD et al., 2016).

Além das glicoproteínas, o envelope também é formado, em menor número, por uma proteína de membrana tetramérica integral, a proteína da Matrix 2 responsável pela atividade de canal iônico (PINTO et al., 1992). Na superfície interna do envelope está presente a proteína da Matrix 1 e em pequenas quantidades, a proteína NEP/NS2, um componente consistente dos vírions. O núcleo viral compreende os oito segmentos de RNA (890-2341 nucleotídeos (nt)). Cada segmento de RNA é encapsulado pela nucleoproteína viral que está associado às subunidades de RNA polimerase (PB1, PB2 e PA), para constituir unidades ativas de replicação/transcrição do vírus influenza, chamadas de complexos de ribonucleoproteína viral (RNP) (SHAW; PALESE, 2013) .

De acordo com a caracterização antigênica das glicoproteínas de superfície, hemaglutinina e neuraminidase, os IAVs são classificados em 18 subtipos de HA (H1–H18) e 11 subtipos de NA (N1 – N11) (FOUCHIER et al., 2005). Os IVs também são classificados em tipos A, B ou C devido à presença de diferenças antigênicas na nucleoproteína, na proteína de matriz e na composição do genoma (HORIMOTO; KAWAOKA, 2005; TAUBENBERGER; KASH, 2010; SANTOS; ROMANOS; WIGG, 2015). A nomenclatura dos vírus influenza deve seguir os seguintes critérios: primeiro, o tipo de vírus é designado (A, B ou C), depois o hospedeiro (se não humano), local de isolamento, número de isolamento e ano de isolamento (separados por barras). Para IAV, os subtipos HA (H1–H18) e NA (N1–11) são indicados entre parênteses, como o seguinte exemplo: A/ Hong Kong/1/68 (H3N2) (SHAW; PALESE, 2013; BROOKS et al., 2014).

### 2.3.2 Epidemiologia

A influenza é uma doença respiratória aguda altamente contagiosa, de caráter zoonótico, que afeta um amplo espectro de hospedeiros. É uma enfermidade de distribuição global, que ocorre anualmente de forma sazonal causando epidemias (COSTA; MERCHAN-HAMANN, 2016).

As aves aquáticas são consideradas o reservatório natural da influenza A e contribuem significativamente para a disseminação do vírus por meio de seus padrões de migração em rotas específicas (OLSEN et al., 2006). Atualmente, quase todas as combinações de HA e NA foram detectadas em aves, principalmente em gaivotas (BEARE; WEBSTER, 1991; FOUCHIER et al., 2005; OLSEN et al., 2006).

Evidências de infecção por IAVs foram relatadas em espécies de mamíferos das famílias Mustelidae, Procyonidae, Sciuridae, Viverridae, Canidae, Felidae e Suidae (MERRILL, 1982; ZEINER et al., 1990; LANSZKI, 2003; WYCKOFF et al., 2005; VANDALEN et al., 2009). A adaptação à transmissão para novos hospedeiros é um processo multifatorial que envolve as altas taxas de mutação, favorecidas pela presença de genoma RNA segmentado, características do hospedeiro, além de fatores ambientais e antrópicos (SOORYANARAIN; ELANKUMARAN, 2015).

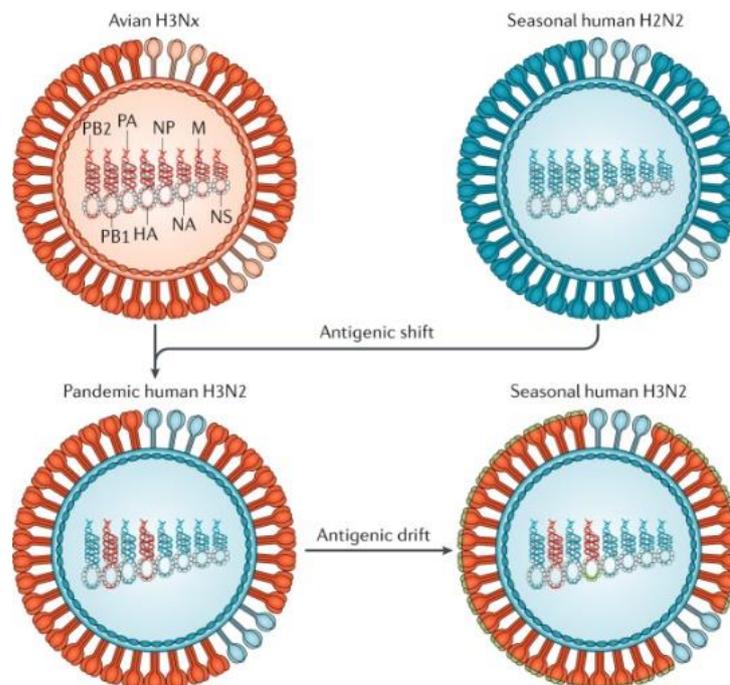
Os vírus da Influenza humana são transmitidos pela via respiratória, enquanto os vírus da Influenza aviária em aves são transmitidos pelas vias, fecal-fecal, fecal-oral ou fecal-respiratória. Dependendo da via de transmissão, o vírus tem como alvo as células epiteliais do trato respiratório ou intestinal para infecção e replicação produtiva (TAUBENBERGER; KASH, 2010). A gravidade da infecção em humanos está associada à replicação do vírus no trato respiratório inferior, que é acompanhada por inflamação grave devido à infiltração de células imunes (SANTOS et al., 2015). A Influenza suína é uma doença respiratória semelhante à humana, com febre alta e pneumonia causada pelos subtipos H1N1, H3N2 e H1N2 (SONG et al., 2010).

Os vírus Influenza A aviários são classificados de acordo com sua patogenicidade, conhecidos como LPAI (*low-pathogenic avian influenza*) e HPAI (*highly pathogenic avian influenza*) (HORIMOTO; KAWAOKA, 2005). Os LPAIs são mantidos em aves aquáticas selvagens geralmente sem desenvolver sinais clínicos graves da doença. Os sinais clínicos em aves domésticas induzidas por LPAIs incluem redução do peso corporal e/ou ligeira queda na produção de ovos em aves poedeiras (SWAYNE; SUAREZ, 2000). Em contraste com os

LPAIs, os HPAIs causam infecções sistêmicas letais e podem provocar a morte de frangos em até 24 horas. Estes carregam um local de clivagem multibásico em sua proteína HA e causam até 100% de mortalidade em várias espécies de aves (CHEN et al., 1998; STEINHAEUER, 1999; SWAYNE; SUAREZ, 2000; ALEXANDER, 2000).

A evolução genômica do vírus influenza A é caracterizada por uma interação complexa de mutações pontuais que resultam na alteração das proteínas transcritas (SUZUKI, 2005). Essas mutações são erros aleatórios introduzidos durante a cópia do RNA denominado deriva antigênica (WEBSTER et al., 1979) (Figura 3). Esse processo torna os vírus da influenza capazes de evadir a imunidade, mediada por anticorpos induzidos durante infecções ou vacinações anteriores, acumulando gradualmente mutações na HA e NA (WEBSTER et al., 1992). Devido à deriva antigênica, atualizações frequentes das vacinas contra influenza são necessárias, a fim de garantir uma relação antigênica suficiente entre a vacina e as variantes virais emergentes (NICHOLSON et al., 2003).

Em contraste com a deriva antigênica, o deslocamento antigênico refere-se a mudanças drásticas na antigenicidade da HA dos vírus influenza A circulantes e está associada a pandemias. Essas estirpes reorganizadas podem ser a fonte de novas variantes pandêmicas que incorporam hemaglutinina e/ou proteínas de neuraminidase contra as quais os hospedeiros não terão imunidade prévia para combater a infecção (LANDOLT; OLSEN, 2007) (Figura 3).



**Figura 3:** Representação da ocorrência de deslocamento antigênico e deriva antigênica no vírus da Influenza A. Fonte: KRAMMER et al., 2018.

Dessa forma a evolução dos vírus influenza está altamente associada à natureza genômica do vírus. A deriva antigênica está relacionada à ocorrência de transmissão interespecífica, alta transmissibilidade dentro de uma população, pressão imunológica e suscetibilidade dos hospedeiros (SHAO et al., 2017; BROWN, 2000).

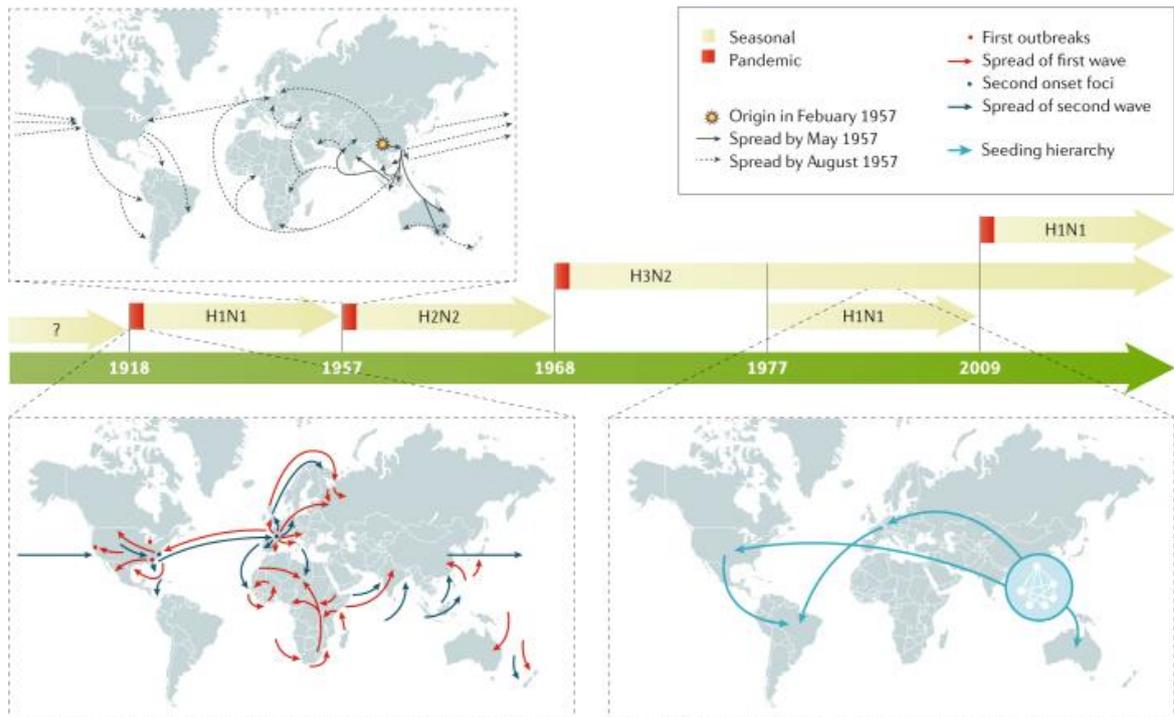
Os suínos possuem um papel importante na mudança antigênica, uma vez que podem ser infectados por IAVs de aves e humanos (SHAO et al., 2017). A mais recente pandemia humana foi em 2009 devido a um rearranjo do vírus influenza A H1N1 com uma composição genética de segmentos genômicos de origem do vírus suíno triplo rearranjado da América do Norte e também do vírus suíno tipo aviário da Eurásia (GARTEN et al., 2009).

### 2.3.3 Histórico

As epidemias de Influenza ocorrem em todo o mundo e causam um fardo socioeconômico substancial (SONG et al., 2010). A Organização Mundial da Saúde (OMS) relatou uma taxa de ataque global anual de Influenza estimada de 5 a 10% em adultos e 20 a 30% em crianças, e até 650.000 mortes anuais estão associadas a doenças respiratórias por influenza sazonal. O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que a Influenza resultou entre 9,2 milhões e 35,6 milhões de pessoas desenvolvendo a doença e entre 140.000 e 710.000 hospitalizações anualmente desde 2010 (HORIMOTO; KAWAOKA, 2005; THOMPSON et al., 2009; OMS, 2009a).

A primeira pandemia oficial ocorreu no ano de 1580. Essa pandemia teve origem no continente Asiático e se estendeu para a África e Europa e posteriormente para a América. Porém, o vírus foi isolado pela primeira vez somente no ano de 1930, sendo classificado como vírus Influenza A (SANTOS et al., 2015).

Nos últimos 500 anos, ocorreram aproximadamente 14 pandemias de IAV e nos últimos 120 anos houveram pandemias relatadas nos anos de 1889, 1918, 1957, 1968, 1977 e 2009 (TAUBENBERGER; MORENS, 2009) (Figura 4). Em 1918, a pior pandemia registrada na história causou aproximadamente 675.000 mortes totais nos Estados Unidos e matou até 50 milhões de pessoas em todo o mundo (JOHNSON; MUELLER, 2002). As pandemias de 1957 e 1968 causaram aproximadamente 70.000 e 34.000 mortes nos Estados Unidos, respectivamente (THOMPSON et al., 2009).



**Figura 4:** Distribuição cronológica das Pandemias mundiais de Influenza A. Fonte: KRAMMER et al., 2018.

Em 2009, a Organização Mundial da Saúde declarou a pandemia do vírus H1N1 triplo-rearranjado (2009/H1N1), que surgiu na população humana nos Estados Unidos e no México e rapidamente se espalhou pelo mundo (OMS, 2009a). Esse vírus, H1N1pdm09 apresenta a característica predominante de transmissibilidade eficiente entre humanos e aumento da virulência, como demonstrado em modelos animais e em alguns humanos, em comparação aos vírus influenza H1N1 sazonal, anterior à pandemia (ITOH et al., 2009; MUNSTER et al., 2009; VAILLANT et al., 2009).

A história do vírus influenza A (H1N1) é pontuada por transmissões cruzadas frequentes e esporádicas de suínos para humanos. Embora os vírus suínos transmitidos esporadicamente sejam suficientemente patogênicos em humanos para causar doença clinicamente aparente, eles raramente são transmitidos entre humanos. A exposição e a infecção são necessárias, mas não suficientes para o surgimento de um novo vírus epidêmico; o vírus também deve se adaptar e transmitir (PARRISH et al., 2008).

Uma série de revisões cobrindo diferentes aspectos da pandemia de 1918 foram publicados e relatam que o vírus de 1918 é o provável ancestral de todas as quatro linhagens humanas e suínas de H1N1 e H3N2 subsequentes, bem como da linhagem H2N2 "extinta". A reconstrução do genoma viral dos tecidos de várias vítimas demonstrou que o agente causador

era um vírus H1N1 descendente de aves (REID et al., 1999; TAUBENBERGER et al., 2000; TAUBENBERGER et al., 2005).

As estirpes de IAV foram consistentemente isoladas de porcos e cavalos, mas apenas esporadicamente de outros mamíferos domésticos e selvagens (WRIGHT; WEBSTER, 2001). Não está claro se existem hospedeiros estáveis de IAV de mamíferos selvagens ou se infecções zoonóticas ocasionais levam a surtos localizados que não persistem. Apenas programas de vigilância adicional poderão responder a esta pergunta (NEUMANN et al., 2009).

#### 2.3.4 Patogenicidade

O vírus Influenza A causa doença respiratória grave e apresenta fácil transmissão. A infecção em mamíferos ocorre através de contato direto com infectados, contato com fômites, superfícies contaminadas e inalação de aerossóis com o vírus (SANTOS et al., 2015). A forma mais eficaz de transmissão é pela inalação de aerossóis, principalmente por meio de gotículas expelidas pela tosse, espirros e fala (SHINYA et al., 2006; YAMADA et al., 2010).

A influenza pode apresentar-se de forma branda ou grave, com complicações e evolução para óbito (YANG et al., 2009). O período de incubação é de 1 a 4 dias, podendo variar de acordo com o sistema imunológico do hospedeiro e com a quantidade do inóculo viral (KAWAOKA, 2013). As altas taxas de replicação ocorrem nas primeiras 48 horas após contato com o vírus e nos dias restantes da infecção a carga viral tende a diminuir (BROOKS et al., 2014).

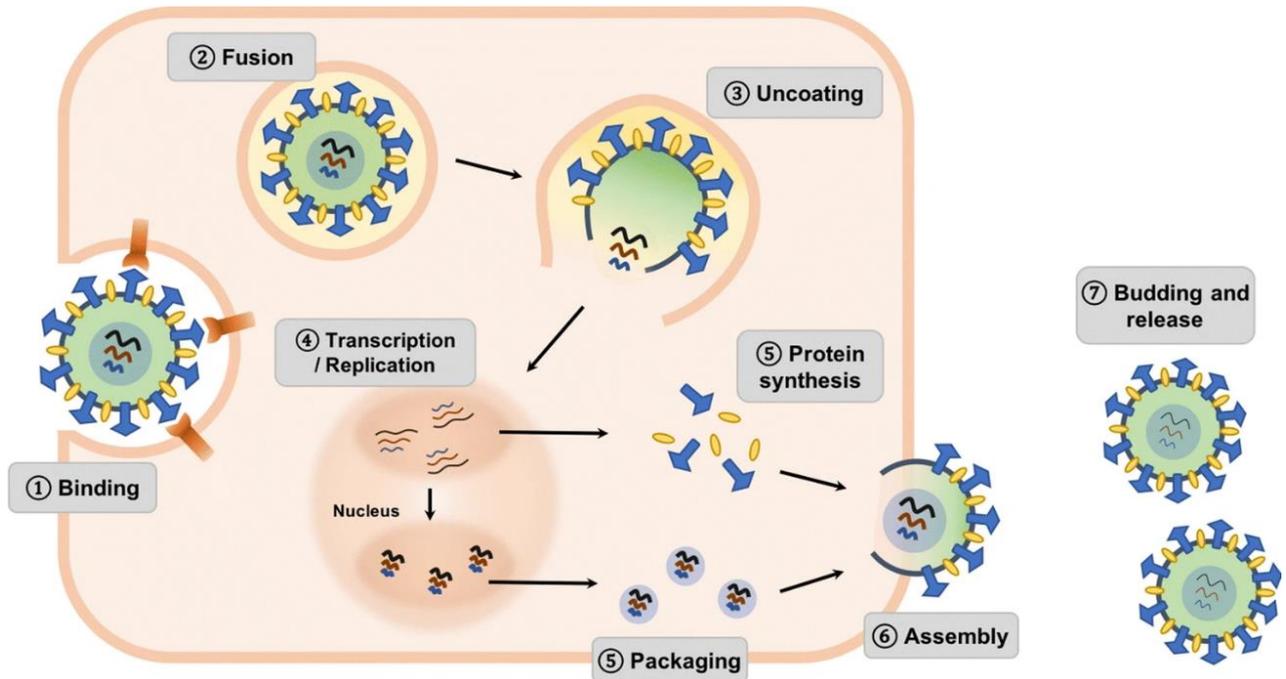
Dentro do grupo do vírus influenza A, as características virais são muito diferentes em termos não apenas de transmissibilidade, mas também de gravidade. Por exemplo, a taxa de letalidade de H1N1 é <15%, e as taxas de letalidade de H5N1 e H7N9 são superiores a 50% e 20%, respectivamente. Além disso, alguns vírus da Influenza A aviária, especialmente os do subtipo H7, têm sido associados a infecções oculares humanas e conjuntivite (FOUCHIER et al., 2005; MUNSTER et al., 2009; FENG et al., 2018; YANG et al., 2009; THOMPSON et al., 2009; CDC, 2011).

A patogenicidade do IAV é uma característica complexa e multigênica, que é afetada por diversos fatores virais e do hospedeiro (MOSTAFA et al., 2013). A circulação intensiva de AIVs em reservatórios animais resulta ocasionalmente no surgimento de características genéticas, que são pelo menos suficientes para permitir que o vírus atravesse a barreira de

transmissão animal-humano. Além disso, mudanças genéticas que melhoram a aptidão viral de AIVs zoonóticos podem ser obtidas no novo hospedeiro humano (REPERANT et al., 2008a).

O IAV se replica nos mamíferos principalmente nas células epiteliais do nariz, garganta e pulmões; e em células epiteliais do sistema intestinal em aves. No entanto, também é capaz de se replicar em células imunes, como macrófagos alveolares e células dendríticas, os quais são responsáveis por iniciar a resposta imune inata contra a infecção (MÜLLER et al., 2012).

O ciclo celular (Figura 5) do vírus começa com a ligação à célula alvo. Neste momento a HA desempenha um papel fundamental por ser responsável pela ligação do receptor viral à membrana da célula hospedeira, possuindo efeito direto na replicação e adaptação a novos hospedeiros (STEVENS et al., 2006). A afinidade da HA para resíduos específicos de ácidos siálicos (SIA) é um determinante principal da gama de hospedeiros. A clivagem da HA é essencial para a infectividade viral. A exposição do terminal amino da HA2 (o chamado 'peptídeo de fusão') medeia a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, uma etapa essencial para a liberação de vRNP no citoplasma. Como o pH endossomal varia entre as espécies hospedeiras, a estabilidade do pH da HA é um dos determinantes do tropismo viral e a clivagem da HA é determinada pela sequência de aminoácidos no local de clivagem (MITNAUL et al., 2000; PINTO; LAMB, 2006).



**Figura 5:** Ciclo de vida viral da Influenza A. Fonte: AMPOMAH; LIM, 2019.

A neuraminidase forma uma proteína spike tetramérica com atividade enzimática, que medeia na superfície das células hospedeiras infectadas a remoção enzimática de SIAs. Para a infecção, transmissão e adaptação ao hospedeiro de IAV ideais, um equilíbrio entre a força da atividade de ligação ao receptor pela HA e a atividade de destruição do receptor pela NA são importantes (MITNAUL et al., 2000; XU et al., 2012).

Uma vez dentro do citoplasma da célula hospedeira, os sinais de localização nuclear (NLS) presentes na NP viral, parte do vRNP, reconhecem e se ligam à maquinaria de importação nuclear do hospedeiro, que medeia a entrada no núcleo e a subsequente replicação viral (WU WW; PANTE N, 2009; GABRIEL et al., 2011).

A replicação e transcrição dos RNAs virais são realizadas pelas três subunidades da polimerase PB2, PB1 e PA, e pela nucleoproteína. Os complexos de ribonucleoproteína viral recém-sintetizados são exportados do núcleo para o citoplasma pela proteína de exportação nuclear e a proteína da matriz M1, para então serem montados vírions na membrana plasmática (SHAW; PALESE, 2013; BROOKS et al., 2014; EISFELD et al., 2015).

Todos os oito genomas segmentados de IAV devem estar presentes para que um virion se torne uma partícula totalmente infecciosa (BOUVIER; PALESE, 2008). O IAV é transportado para a superfície da célula para então ser liberado ou brotar da célula hospedeira. Na membrana plasmática, as proteínas NA, HA e M2 incorporadas se reúnem com segmentos genômicos virais para formar um virion, e as proteínas M1 e M2 medeiam o fechamento final

e o brotamento (NAYAK et al., 2004; CHEN; LAMB, 2008). Além disso, a NA libera resíduos de ácido siálico na superfície da célula hospedeira, permitindo a infecção subsequente de células vizinhas (HUI; NAYAK, 2002).

### 2.3.5 Receptores de Ácido Siálico

Todas as células de mamíferos são cobertas por um denso glicocálice, composto por glicolipídios, glicoproteínas, âncoras glicofosfolipídicas e proteoglicanos (VARKI, 1997; (DRICKAMER K; TAYLOR M., 2006; VARKI, 2007. Os ácidos siálicos compreendem uma família de nove monossacarídeos de carbono que geralmente são encontrados na cobertura mais externa de glicanos, os quais estão ligados a glicoproteínas e glicolipídios da superfície celular (SCHWARZKOPF et al., 2002). Desempenham funções intrínsecas importantes e são necessários para o desenvolvimento normal do organismo (SCHWARZKOPF et al., 2002). Por outro lado, dada a sua localização terminal nos glicanos, é natural que essa diversidade tenha sido utilizada por uma grande variedade de proteínas de ligação aos SIAs, sendo mais conhecidas as de muitos patógenos virais e bacterianos (ANGATA; VARKI, 2002; VARKI, 2007; ILVER et al., 2003; STRASSER et al., 2003; SHARON, 2006).

Um fator importante na patogênese do vírus da Influenza A é o tropismo tecidual, que depende em grande parte da capacidade do vírus em se ligar à célula hospedeira (BAIGENT; MCCAULEY, 2003). As HAs dos vírus influenza A de diferentes espécies hospedeiras diferem em sua especificidade de ligação. Por exemplo, HAs de vírus influenza A humanos reconhecem preferencialmente sacarídeos terminados em ácido siálico  $\alpha$ -2,6-SIA, enquanto HAs de vírus influenza aviário reconhecem preferencialmente sacarídeos terminados em  $\alpha$ -2,3-SIA (ROGERS; PAULSON, 1983; CONNOR et al., 1994; SUZUKI et al., 2000). Portanto, o tipo e a distribuição da SIA são considerados fatores importantes na suscetibilidade de diferentes espécies de hospedeiros aos vírus influenza A (SUZUKI et al., 2000).

Existem vários métodos para identificar os SIAs em glicolipídios e glicoproteínas nos tecidos, incluindo microrganismos, proteínas solúveis, receptores recombinantes de mamíferos e anticorpos (VARKI, 2007). Um método tradicional para estudar o tropismo tecidual de diferentes vírus influenza A é medir a distribuição de SIAs pelo uso de histoquímica de lectina (VARKI, 1997). As lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam a estruturas de carboidratos definidas e pode ser de origem animal, microbiana ou vegetal (LORIS, 2002; SHARON, 2007).

O vírus da gripe e as lectinas causam hemaglutinação por mecanismos semelhantes. A hemaglutinina do vírus influenza reconhece oligossacarídeos na superfície dos glóbulos vermelhos, levando a agregação e aglomeração. Lectinas também reconhecem os ácidos siálicos ligados aos oligossacarídeos, levando à agregação (NICHOLLS et al., 2008). Estudos sobre receptores para o vírus influenza têm feito uso das lectinas vegetais *Sambucus nigra* (SNI), que tem maior especificidade para  $\alpha$ -2,6-SIA, e aglutinina de *Maackia amurensis* (MAA), que tem maior especificidade para  $\alpha$ -2,3-SIA (BAUM; PAULSON, 1990; SHINYA et al., 2006).

Embora úteis para determinar a distribuição de SIAs nos tecidos, essas técnicas de histoquímica de lectina são apenas uma medida indireta da ligação do vírus influenza A aos tecidos do hospedeiro. Estudos recentes com vírus marcados também sugeriram que nem todas as células que se ligam a vírus resultam em replicação viral, indicando que outros eventos intracelulares determinam replicação viral produtiva (KUIKEN et al., 2006). Essas técnicas não consideram outras variáveis que influenciam a especificidade de ligação. Para HA, estes incluem glicosilação e sialilação próxima do sítio de ligação do receptor; para o receptor, estes incluem tipo de SIA, ligações alternativas, sulfatação e fucosilação dos resíduos de sacarídeos (SUZUKI, 2005; WU; AIR, 2004; GAMBARYAN et al., 2006).

Apesar das limitações, estudos de histoquímica de lectina têm contribuído no avanço de estudos referentes a Influenza A. O uso das lectinas vegetais demonstrou que as células ciliadas, em vez de células caliciformes, seriam um alvo para a infecção por influenza em humanos. Esses estudos foram ampliados e demonstraram que a mucina brônquica humana é capaz de inibir a ligação do vírus a ligação  $\alpha$ -2,3 mais do que a ligação  $\alpha$ -2,6. (BAUM; PAULSON, 1990).

Diante da escassez de SIAs  $\alpha$ -2,3 na traqueia humana, como detectado pela ligação de MAA, e devido aos vírus aviários não replicarem bem em humanos experimentalmente infectados, a hipótese de que um vírus aviário precisaria se adaptar em um hospedeiro intermediário foi desenvolvida (BEARE; WEBSTER, 1991). Este hospedeiro precisaria ter os dois tipos de receptores, antes de se adaptar à transmissão para humanos. Demais estudos de ligação de lectina demonstraram que os suínos possuem ambos os tipos de receptores em células epiteliais respiratórias, sendo, por isso, considerados um hipotético “recipiente de mistura” (SCHOLTISSEK et al., 1985). Devido a susceptibilidade a coinfeção por vírus Influenza de origens diferentes, estes hospedeiros permitem o rearranjo e o surgimento de novas estirpes virais com significativa importância para a saúde pública (SUZUKI et al., 2000).

A evolução dos vírus da Influenza ainda se apresentam de forma complexa e ativa. Alguns estudos demonstraram que galinhas e codornas podem atuar como hospedeiros intermediários, nos quais os vírus aviários podem ser amplificados e transmitidos para outras espécies animais (LIN et al., 2000). Alguns pesquisadores sugerem que as aves terrestres também atuam como “recipiente de mistura” e disseminadores de vírus influenza A rearranjados de aves/mamíferos (VINCENT et al., 2014; WAN; PEREZ, 2006).

Estudos em furões (*Mustela vison*) infectados com o vírus influenza de 1918 recombinante mostraram que, apesar da replicação no trato respiratório superior (anteriormente considerado um requisito para a transmissão), o vírus com uma preferência de ligação SIA  $\alpha$ -2,3 pura não mostrou transmissão de furão para furão (TUMPEY et al., 2007). Aqueles com ligação SIA  $\alpha$ -2,3 e SIA  $\alpha$ -2,6 mostraram transmissão ineficiente e apenas aqueles com preferência SIA  $\alpha$ -2,6 mostraram transmissão eficiente, indicando que não foi um ganho de preferência SIA  $\alpha$ -2,6 vinculativa que resultou na transmissão, mas, em vez disso, uma perda de SIA  $\alpha$ -2,3. Dessa forma, sugere-se que a ligação do vírus levando à replicação não é o único caminho de preocupação, mas também como uma mudança na ligação preferencial é capaz de desencadear vias no hospedeiro que resultam na transmissão viral eficiente (NICHOLLS et al., 2008).

### 2.3.6 Influenza em mesopredadores

Evidências de infecção por IAV foram relatadas em diversas espécies de mamíferos e as espécies caracterizadas como mesopredadoras selvagens merecem importante destaque (MERRILL, 1982; ZEINER et al., 1990; WYCKOFF et al., 2005). Os mesopredadores são mamíferos como guaxinins, raposas, quatis e gambás que ocupam níveis intermediários na cadeia trófica, podendo variar sua posição de acordo com a presença ou ausência de predadores de topo de cadeia. Possuem porte médio, são geralmente onívoros e de distribuição generalizada, incluindo habitats selvagens, fazendas e áreas urbanas (SOULÉ et al., 1988; KOWALSKI et al., 2015).

Guaxinins (*Procyon lotor*) são comuns em muitas comunidades urbanas e suburbanas dos Estados Unidos. Esta espécie é altamente adaptável, ocupando diversos habitats, com dieta oportunista onívora e obtendo seu sustento a partir do consumo de uma grande variedade de plantas e animais (FITZGERALD et al., 1994; SCHMIDLY et al., 2004). São considerados uma ameaça à saúde pública por carregarem várias doenças zoonóticas, como a raiva, e

apresentam potencial participação nos ciclos de transmissão dos vírus da Influenza (NICHOLLS et al., 2008).

Um estudo realizado por Hall et al. (2008) avaliou a exposição de guaxinins aos vírus da Influenza em seis estados americanos. Neste estudo, amostras biológicas de 730 guaxinins selvagens foram coletadas. Dentre os animais amostrados, 17 (2,4%), provenientes de três desses estados, possuíam anticorpos para os subtipos H1, H3, H4N2, H4N6 e H10N7. Seus resultados indicaram que os guaxinins selvagens são expostos a uma variedade de subtipos do vírus e apresentam capacidade de soroconversão quando infectados.

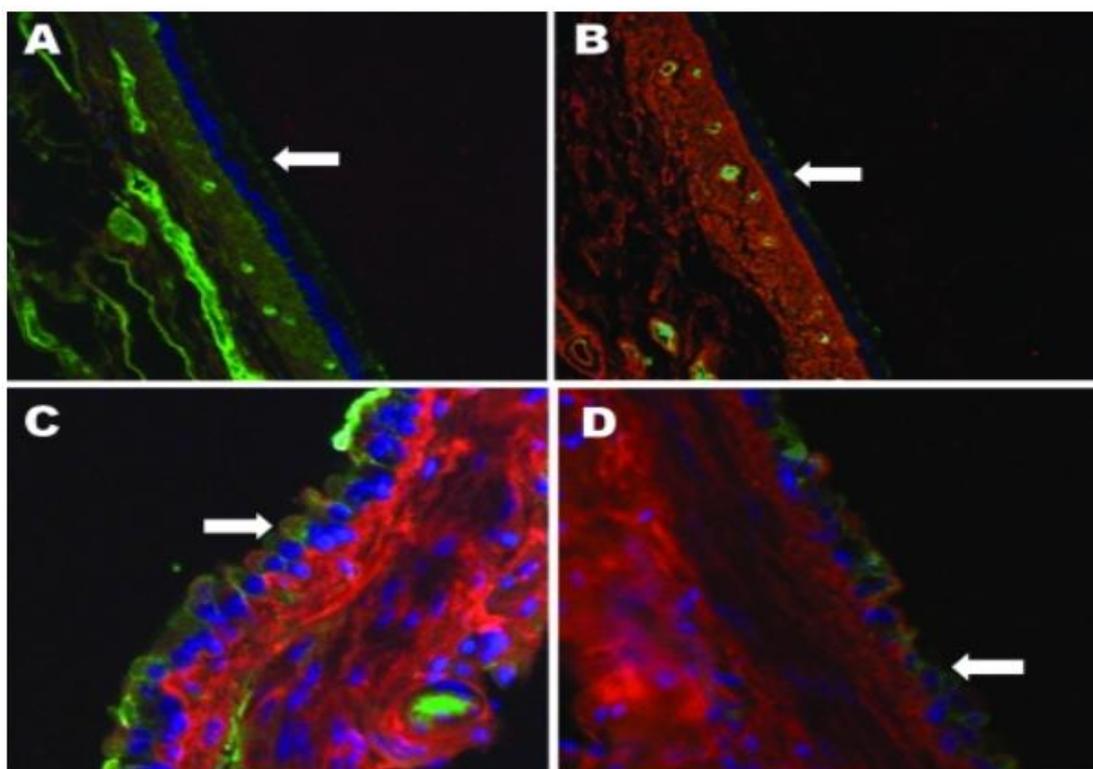
Evidências sorológicas também são apresentadas em outros estudos com mesopredadores, Roberts et al. (2009) descreveram um guaxinim, habitante de uma região de granja aviária na Pensilvânia, positivo para anticorpos H4N6. No Japão, soroconversão a diferentes subtipos de IAVs foram detectados em guaxinins selvagens (*Procyon lotor*) (HORIMOTO et al., 2011). Semelhante aos resultados encontrados nos EUA, uma segunda pesquisa sorológica no Japão mostrou que as detecções de anticorpos para IAV em guaxinins eram irregulares, com todas as detecções de anticorpos ocorrendo em três dos 18 locais pesquisados (HALL et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2014).

A fim de compreender a permanência de anticorpos para IAVs em guaxinins, Root et al. (2010) mantiveram em cativeiro sete guaxinins selvagens (*Procyon lotor*) que haviam sido expostos a múltiplos subtipos virais, por 279 dias. Amostras de soro foram coletadas em 10 ocasiões diferentes durante este intervalo de tempo. Embora declínios de título tenham sido observados na maioria dos animais ao longo do tempo, todos os animais mantiveram anticorpos detectáveis durante o estudo. Estes dados indicam que os anticorpos adquiridos naturalmente para o vírus da influenza A podem permanecer detectáveis em guaxinins após vários meses à exposição.

Hall et al. (2008) também realizaram a inoculação via intranasal do subtipo H4N8 em oito guaxinins, realizando o monitoramento destes animais por 14 dias. Após esse período, três desses animais apresentaram liberação de quantidades detectáveis de vírus. As análises de qRT-PCR de amostras retais não mostraram nenhum RNA viral detectável eliminado pelo sistema digestório, o que é condizente com a influenza, por ser considerada uma doença primariamente respiratória em mamíferos (BAIGENT; MCCAULEY, 2003).

Demais pesquisas descreveram que guaxinins possuem ambos os tipos de receptores em seus sistemas respiratórios, de forma semelhante aos suínos, mas com distribuição desigual entre os tecidos (HALL et al., 2008). No epitélio superior da traqueia, o receptor predominante

é o tipo humano SIA  $\alpha$ -2,6. À medida que se examina os tecidos inferiores do sistema respiratório, quantidades crescentes do receptor aviário SIA  $\alpha$ -2,3 são encontradas, até que os dois tipos de receptores estejam em quantidades aproximadamente iguais nos pulmões (SHINYA et al., 2006; TUMPEY et al., 2007). A presença de receptores humanos e de aves no sistema respiratório de guaxinins propicia a possibilidade de coinfeção com vários tipos de vírus influenza e, como em suínos, o rearranjo genético e a criação de novas estirpes possivelmente altamente virulentas (HALL et al., 2008) (Figura 6).



**Figura 6:** Tecidos respiratórios de guaxinim (*Procyon lotor*) corados com lectinas específicas para ácidos siálicos (SIAs) com ligações  $\alpha$ 2,6 e  $\alpha$ 2,3. A) traqueia superior; B) traqueia inferior; C) brônquio; D) bronquíolo. As setas indicam o revestimento endotelial dos tecidos indicados. A coloração verde mostra uma reação com a lectina de *Sambucus nigra* marcada com isotiocianato de fluoresceína, que indica SIAs ligados à galactose por uma ligação  $\alpha$ 2,6. A coloração vermelha mostra uma reação com lectina *Maackia amurensis* biotinizada (detectada com Alexa Fluor 594 - estreptavidina conjugada), que indica uma ligação SIA  $\alpha$ 2,3. Os tecidos foram contrastados com dicloridrato de 4,6 -diamidino-2-fenilindol. Ampliação original 40x nas figuras A, B e D e 100x na figura C. Fonte: HALL et al., 2008.

Durante meados de dezembro de 2009 a janeiro de 2010, oito gambás listrados (*Mephitis mephitis*) morreram em uma fazenda de visons perto de Vancouver, British Columbia, Canadá. Dois destes gambás passaram por exame *post-mortem* no Animal Health Center em Abbotsford, British Columbia e apresentaram pneumonia grave com 70% de comprometimento do campo pulmonar. A partir da análise de RT-PCR, amostras de órgãos foram positivas para o H1N1

pandêmico de 2009, confirmado pela análise da sequência de fragmentos de RNA obtidos nos testes de hemaglutinina, neuraminidase e gene da proteína M (BRITTON et al., 2010). Outro estudo comprovou que gambás listrados possuem potencial de liberar grandes quantidades de RNA viral pelas vias oral e nasal após a exposição a um AIV de baixa patogenicidade (ROOT et al., 2014).

Em estudo experimental Reperant et al., (2008) avaliaram o potencial de transmissão da IAV em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*), infectando-as com HPAI H5N1, por inoculação via intratraqueal. Em seus resultados ocorreu a eliminação do vírus por 3 – 7 dias e desenvolvimento de pneumonia grave, miocardite e encefalite. No entanto, as raposas que foram alimentadas com carcaças de aves infectadas também espalharam o vírus por 3–5 dias, mas desenvolveram apenas sinais leves da doença, concluindo que essa espécie pode desempenhar um papel na dispersão do vírus.

Os riscos associados aos mesopredadores e à Influenza para a saúde humana são desconhecidos, o que justifica claramente mais pesquisas direcionadas ao assunto. As evidências que temos hoje, ressaltam a importância de se investigar os papéis dessas espécies na epidemiologia da influenza (HALL et al., 2008).

### 2.3.7 Diagnóstico

O diagnóstico de influenza em humanos é feito principalmente com base na apresentação clínica e na probabilidade epidemiológica de infecção. O início dos sintomas é súbito e predominam sintomas inespecíficos como febre, calafrios, dores de cabeça, mialgia (dor muscular), mal-estar (desconforto) e anorexia. Sintomas respiratórios como tosse seca, dor de garganta, obstrução e secreção nasal, geralmente também estão presentes (KRAMMER et al., 2018).

Outros patógenos respiratórios como vírus parainfluenza, vírus sincicial respiratório, adenovírus, rinovírus e coronavírus possuem manifestações clínicas semelhantes à influenza. Por este motivo o diagnóstico com base na apresentação clínica tem precisão razoável (OHMIT; MONTO, 2006). Devido aos sintomas inespecíficos, o número de casos diagnosticados é subestimado. No Brasil, laboratórios credenciados pela OMS são responsáveis por identificar de forma antecipada a presença de novos tipos e subtipos virais e em divulgar informações epidemiológicas e filogenéticas acerca dos vírus Influenza circulantes no país a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

Assim como para os humanos, o diagnóstico de animais positivos é importante para as ações de vigilância epidemiológica. O processo de diagnóstico começa com a amostragem correta selecionando preferencialmente animais que apresentem a fase aguda da infecção (JANKE, 2000). Posteriormente à coleta, o armazenamento correto das amostras e desenvolvimento de testes adequados são essenciais para a detecção do vírus, assim contribuindo com o controle de surtos e prevenção da infecção.

Geralmente, *swabs* nasofaríngeos são coletados de humanos para o diagnóstico, podendo também ser realizada lavagem nasal ou *swab* combinado de garganta e nasal. As amostras devem ser obtidas preferencialmente em até três dias do início dos sintomas garantindo a sensibilidade dos testes (KRAMMER et al., 2018). Para o diagnóstico molecular nos demais mamíferos, amostras de secreção nasal e fluido oral devem ser coletados. O armazenamento deve ocorrer sob refrigeração (4°C) para processamento em até 48 horas ou acondicionamento a -80°C para processamento em períodos superiores (OMS, 2011)

Os testes laboratoriais padrão ouro usados para influenza são cultura viral e PCR seguido de transcrição reversa (RT-PCR). A cultura do vírus, apesar de demorada, é fundamental para a caracterização detalhada de novos vírus, vigilância da sensibilidade aos medicamentos antivirais e monitoramento da deriva antigênica (DUNN et al., 2004). A RT-PCR convencional é usada para detectar a presença ou ausência de RNA, enquanto o RT-PCR quantitativo usa sondas para quantificar ácidos nucleicos virais nas amostras (OMS, 2009b).

Os testes sorológicos de escolha que detectam a presença de anticorpos contra o vírus, são a inibição da hemaglutinação (HI), ELISA e fixação de complemento (VEMULA et al., 2016). O ensaio HI é rápido, relativamente barato e aplicável a diversas espécies (PEDERSEN, 2014).

A base do teste de HI é a inibição da hemaglutinação realizada pela HA em eritrócitos. Quando ocorre a presença de anticorpos específicos para o subtipo, a ligação HA-eritrócitos é inibida, tornando possível a mensuração de anticorpos neutralizantes (BEARD et al., 1980). A confiabilidade deste teste pode ser comprometida se houver a presença de inibidores de hemaglutinação ou problemas relacionados a alterações genéticas (WOOD et al., 1994). Um protocolo detalhado para HI está presente no manual da OMS (OMS, 2002).

Estudos de vigilância também são necessários para a compreensão do papel de animais selvagens na transmissão de IAVs. Amostras ambientais, de tecidos, *swabs* de orofaringe, nasais e retais podem ser coletadas para análises quanto à presença do vírus, buscando evidências de exposição e infecção atual (VANDALEN et al., 2009). Pesquisas de vigilância

sorológica podem ser realizadas para identificar exposição prévia aos vírus influenza. Em complemento aos estudos de infecções ativas que fornecem apenas informações atuais, esses dados podem ser usados para estimar a proporção de animais ou populações que já foram expostas (VANDALEN et al., 2009).

### 2.3.8 Controle e prevenção

Diante do elevado potencial pandêmico do vírus Influenza A é notável a preocupação com o surgimento de novas pandemias na população humana (SOEMA et al., 2015; KRAMMER; PALESE, 2015).

Para a prevenção e controle de infecções pelo vírus influenza, estão disponíveis vacinas e medicamentos antivirais (NEUMANN et al., 2009). A vacinação ainda é a principal linha de defesa e o método mais eficaz para combater a infecção, porém devido à alta taxa de mutação observada no vírus Influenza A, o controle da doença através da imunização tem suas limitações (HOUSER; SUBBARAO, 2015; KRAMMER; PALESE, 2015; SANTOS et al., 2015).

Devido à grande variação de eficácia da vacina contra influenza (10% a 60% nos Estados Unidos nos últimos anos), com eficácia substancialmente menor em adultos mais velhos ou durante as temporadas de influenza, quando uma nova variante antigênica está circulando, o uso de antivirais permanecem com um papel fundamental no manejo da gripe não complicada associado aos cuidados de suporte (FENG et al., 2018; KRAMMER et al., 2018).

O tratamento antiviral reduz a carga da doença e diminui as taxas de mortalidade e hospitalização, principalmente em pacientes com infecções secundárias que levam à pneumonia (MUTHURI et al., 2014; CUMMINGS et al., 2021). O tratamento deve ser realizado dentro da “janela” de 48 horas evitando que os sistemas de saúde sejam sobrecarregados (REWAR et al., 2016). Além dos benefícios associados ao tratamento antiviral, a profilaxia deve ser garantida durante surtos de gripe em lares ou instituições como medida de proteção adicional (TORNER et al., 2015).

Na criação de animais a profilaxia, a vacinação e o tratamento também são aplicados (CHEN et al., 2012; KRAMMER et al., 2018). O correto manejo nutricional e o bem-estar animal associados as medidas de biossegurança são ações essenciais para evitar a propagação e desenvolvimento do vírus da Influenza. A limpeza e desinfecção corretas, ventilação adequada das instalações, despovoamento, isolamento de animais doentes, segregação de

animais jovens e sistema *all-in-al-out*, são ações de biossegurança extremamente importantes para evitar a propagação do vírus (FLORES et al., 2007).

Como a transmissão do vírus pode ocorrer entre diferentes espécies, medidas de biossegurança também incluem o contato limitado interespecífico, especialmente entre suínos, aves e humanos. A vacinação dos funcionários da cadeia produtiva de suínos é recomendada assim como a troca de roupas ao ar livre e desinfecção de pedilúvios devido à possibilidade de humanos transmitirem o vírus influenza para suínos e vice-versa (NELSON et al., 2015; KRAMMER et al., 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a susceptibilidade de quatis (*Nasua nasua*) de vida livre em parque urbano, à infecção pelos vírus da Influenza A, a partir da investigação soropidemiológica, pesquisa do agente e presença de receptores de ácido siálico em tecidos do sistema respiratório destes animais.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Identificar a presença de anticorpos neutralizantes contra os subtipos H1N1pdm09, H3N2 e H1N1 humano sazonal da Influenza A, a partir da técnica de inibição da hemaglutinação em amostras de soro coletados de quatis de vida livre nos anos 2013, 2014, 2018, 2019 e 2021;
- Verificar a frequência e a distribuição dos subtipos H1N1pdm09, H3N2 e H1N1 humano sazonal da Influenza A em quatis de vida livre;
- Realizar pesquisa para a detecção direta do vírus da Influenza A, a partir de amostras de *swabs* de orofaringe e retais coletadas de quatis de vida livre;
- Avaliar clinicamente, a população de quatis amostrados mediante avaliação física;
- Realizar a detecção e distribuição de receptores de ácidos siálicos,  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6 em tecidos provenientes do sistema respiratório de carcaças de quatis, pela técnica de imuno-histoquímica de lectinas.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de estudo

O projeto foi desenvolvido no Parque Municipal das Mangabeiras (PqM - 19°56'S e 43°53' O), localizado na região sul do município de Belo Horizonte, Minas Gerais. O local é uma área natural de 236 hectares, densamente arborizada que oferece um espaço de turismo e lazer para a população, onde já foram registrados até 20 mil visitantes por mês (dados da administração do PqM).

O parque está presente em uma região de transição entre os biomas Cerrado e Mata Atlântica, o que favorece a presença de grande diversidade biológica. Registros de aproximadamente 320 espécies de plantas, 168 espécies de aves, 16 espécies de mamíferos, 17 espécies de anfíbios e 12 espécies de répteis já foram realizados no local (CÂMARA; LESSA, 1994; ALVES-COSTA, 1998; HEMETRIO, 2007). Sua vegetação inclui Floresta Estacional Semidecídua, Cerradão, Cerrado *stricto sensu* e Campo Rupestre (PEDERSOLI, 1997).

Devido a sua presença em ambiente urbano, os limites do parque sofrem considerável impacto ambiental resultante da pressão antrópica. Esta ocorre devido a presença de três grandes bairros com perfis populacionais e socioeconômicos distintos assim como atividades de mineração de ferro (PORFÍRIO et al., 2006) (Figura 7).



**Figura 7:** Demonstração da ocupação urbana e mineração de ferro ao redor do Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Os quatis são os animais mais característicos do Parque, sendo facilmente visualizados e presentes em densidade mais alta do que registrado em ambientes naturais. Esta condição associada a constantes estímulos de alimentação realizados pela população, resulta em eventuais acidentes envolvendo mordidas e arranhões, assim como favorece a maior presença dos animais fora dos ambientes de mata. Além disso, conseguem acessar o conteúdo das lixeiras do Parque (Figura 8) e o fazem nas casas e estabelecimentos comerciais próximos (Figura 9) (HEMETRIO, 2011).



**Figura 8:** Quati (*Nasua nasua*) em lixeira do Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais. Fonte: Augusto Gomes, 2021.



**Figura 9:** Quatis (*Nasua nasua*) na região limítrofe do Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais. Fonte: Augusto Gomes, 2021.

## 4.2 Licenças

Foram utilizadas amostras de soro de banco de amostras provenientes de quatis de vida-livre capturados no Parque Municipal das Mangabeiras (anos: 2013; 2014; 2018 e 2019) licenças Sisbio 39817-1 e 61968-1 e Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA/UFMG) 274/2013 e 306/2017.

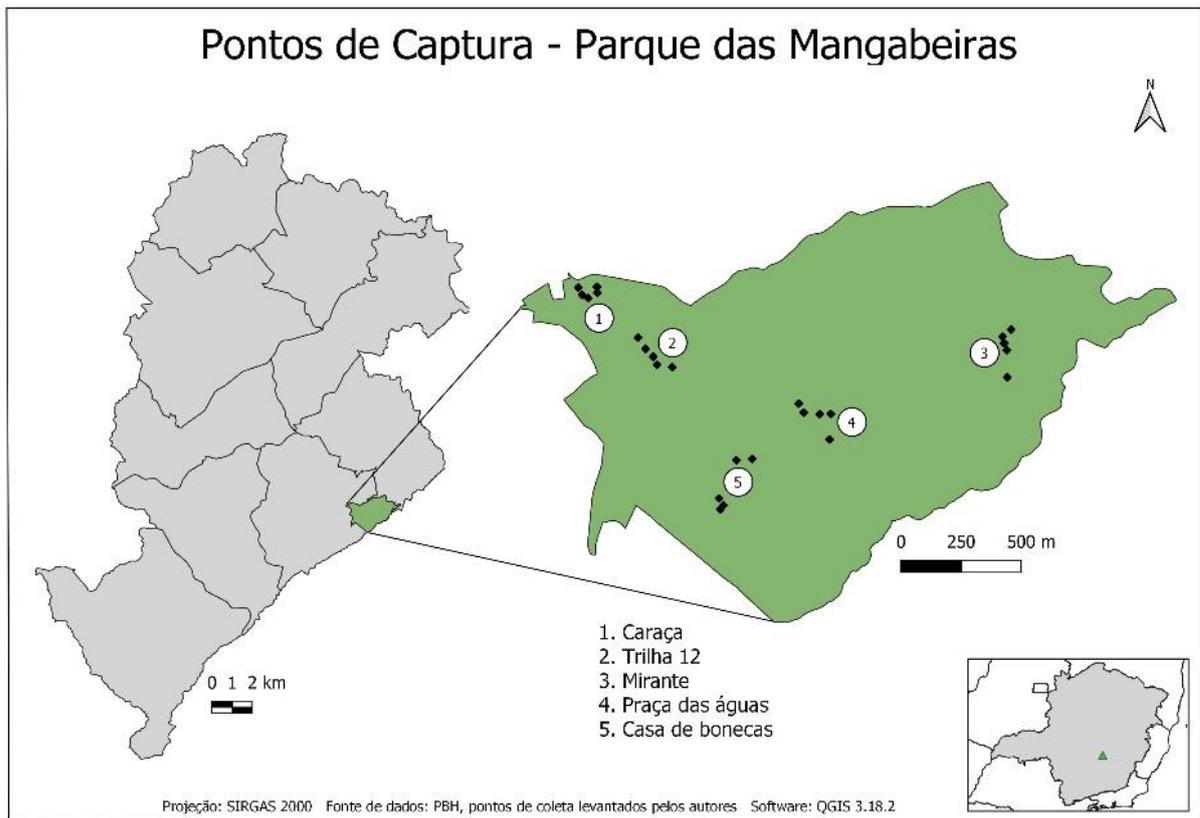
Também foram realizadas coletas de amostras biológicas (sangue total, soro, *swabs* de orofaringe e retais e amostras teciduais provenientes de necropsias) de quatis de vida-livre do Parque no ano de 2021 sob licença aprovada pelo Sisbio número 75831, pela CEUA/UFMG sob protocolos de números 158/2020 e 100/2021 e pela Fundação de Parques Municipais e Zoobotânica de Belo Horizonte sob protocolo FU 004-2020. Ainda, a presente pesquisa encontra-se cadastrada na plataforma SisGen sob o código A7C0AAF.

## 4.3 Captura dos animais

Durante os anos de 2013, 2014, 2018 e 2019 ocorreram capturas de quatis (*Nasua nasua*) no PqM com diferentes objetivos de pesquisa. Ao final dessas pesquisas as amostras remanescentes contribuíram para o desenvolvimento de um banco de amostras. Este banco também contribuiu para o presente estudo diante do fornecimento de amostras de soro.

Com o objetivo verticalizado em desenvolver uma pesquisa referente a susceptibilidade de quatis ao vírus da Influenza A foram realizados esforços de captura durante o ano de 2021. Estes esforços foram realizados nos períodos chuvoso (outubro a janeiro) e seco (abril a setembro), a fim de se estudar também a possível variação sazonal do agente na população de quatis. As capturas ocorreram entre os dias 18 e 21 de janeiro (C1), 16 e 19 de fevereiro (C2), 28 de junho e 9 de julho (C3), e 4 e 13 de agosto (C4).

Os quatis foram capturados por meio de armadilhas colocadas em cinco pontos estratégicos de passagem dos animais, estes nomeados de acordo com os locais do parque: Caraça; Trilha 12; Mirante; Praça das Águas e Casa de Bonecas. Em cada ponto foram colocadas cinco armadilhas referenciadas geograficamente por GPS (Figura 10).



**Figura 10:** Distribuição dos pontos de colocação de armadilhas para a captura de quatis (*Nasua nasua*) no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Foram utilizadas armadilhas de ferro galvanizado do tipo Tomahawk ® com desarme de pedal nas dimensões de 70 cm x 35 cm x 40 cm (Figura 11) e 70 cm x 30 cm x 20 cm. As armadilhas foram revisadas diariamente pela equipe de campo durante os períodos de capturas pela manhã e tarde e iscadas com banana.



**Figura 11:** Armadilha do tipo Tomahawk ® com desarme de pedal de dimensões de 70 cm x 35 cm x 40 cm.

Após capturados, os animais foram inspecionados visualmente para estimativa de peso e cálculo do volume anestésico a ser aplicado. Então, com o auxílio de um embolo (de armadilha), os animais eram contidos dentro da armadilha e realizada a aplicação intramuscular do fármaco Zoletil ® 100 (Virbac®; cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam), o qual o volume foi calculado a partir da dose de referência de 7 a 10 mg/kg (TEIXEIRA; AMBROSIO, 2014).

Diante do efeito anestésico, os animais foram retirados das armadilhas e imediatamente confirmado o peso estimado com o auxílio de uma pesola. Quando necessário, o ajuste de dose foi administrado. O monitoramento anestésico foi realizado mediante aferição das frequências cardíaca e respiratória e temperatura retal. Os animais que não possuíam identificação prévia receberam um implante de microchip subcutâneo na região interescapular e colocação de brinco de polipropileno numerado, com aplicação realizada na orelha direita para as fêmeas e na orelha esquerda para os machos (Figura 12).



**Figura 12:** Quati (*Nasua nasua*) macho sob anestesia após captura e identificação com brinco numerado de polipropileno.

#### 4.3.1 Coleta de amostras biológicas

A coleta de amostras biológicas foi realizada após a identificação dos animais em período inicial do efeito anestésico. A coleta de sangue foi realizada através da punção da veia jugular com auxílio de seringa de 5 ml estéril respeitando o limite máximo de 1% do peso vivo (Figura 13) e acondicionado em tubos com ativador de coágulo. Também foram realizadas coletas de três *swabs* de orofaringe (Figura 14) e três *swabs* retais, acondicionados em tubos Falcon contendo 3 ml de solução salina tamponada - PBS 1X suplementado com penicilina (200 µl /mL), estreptomicina (200 µg/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). Após a coleta, as amostras biológicas foram armazenadas em caixas de isopor e mantidas refrigeradas (4°C) para o transporte à Escola de Veterinária da UFMG.



**Figura 13:** Punção venosa da veia jugular de quati (*Nasua nasua*).



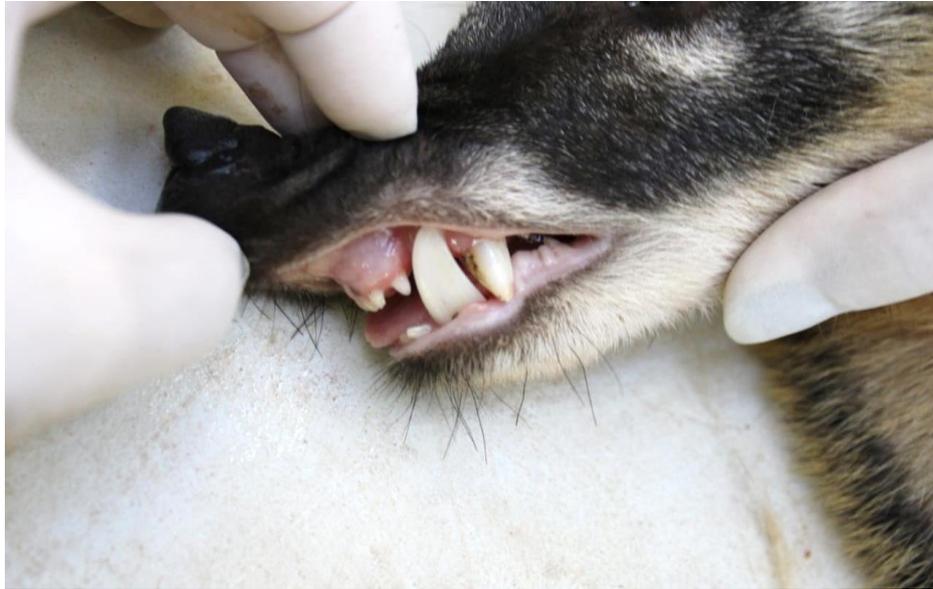
**Figura 14:** Coleta de swab de orofaringe em quati (*Nasua nasua*).

#### 4.3.2 Avaliação biométrica e clínica dos animais

A classificação etária dos animais foi realizada considerando o peso, o desgaste dentário (Figura 15) e a condição reprodutiva (GIPSON et al., 2000; OLIFIERS, 2010).

Os animais classificados como infantes possuíam até 6 meses de idade, presença de dentes de leite e peso médio de 1,5 quilos. Os animais classificados como jovens possuíam até 12 meses, peso médio de 2 quilos e a presença de dentes em fase de troca. Animais classificados como sub-adultos possuíam idade entre 13 e 24 meses, peso entre 2 e 3 quilos e dentes permanentes, enquanto os animais adultos possuíam idade superior a 24 meses, peso superior a

3 quilos e presença de testículos decíduos nos machos e sinais de cio e gestação nas fêmeas (GOMPPER, 1995).



**Figura 15:** Avaliação de desgaste dentário em quati (*Nasua nasua*).

Os animais foram avaliados quanto ao escore corporal em bom, regular e ruim; atividade, como ativo, calmo e excitado; comportamento como alerta, apreensivo, deprimido, agressivo e assustado. O exame clínico incluiu aferição de frequências e auscultas cardíaca e respiratória, e da temperatura retal; avaliação de pele, pelos, porcentagem de desidratação, avaliação de mucosas, cavidade oral, narinas, olhos, orelhas, palpação de linfonodos superficiais, palpação abdominal e inspeção de marcas e cicatrizes aparentes.

Todas as informações obtidas durante os procedimentos a campo foram registradas em fichas individuais, manualmente, para posterior organização em planilhas digitais. Após finalização dos procedimentos de avaliação e coleta de amostras biológicas, os quatis foram devolvidos às armadilhas para recuperação anestésica e posterior soltura no mesmo local de captura.

#### **4.4 Necropsia**

Cadáveres de quatis (*Nasua nasua*) encontrados nas imediações do PqM, incluindo a área peridomiciliar, foram recolhidos, mantidos refrigerados (4°C) e transportados à Escola de Veterinária-UFMG para a realização de exame pós-morte no Setor de Patologia Veterinária do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias.

Inicialmente, o exame externo foi realizado quanto à presença de lesões macroscópicas e ectoparasitas, avaliação da condição corporal e mucosas, seguido do exame detalhado de subcutâneo e vísceras.

Amostras de língua, esôfago, conchas nasais, laringe, traqueia, brônquios, pulmão, coração, baço, linfonodos, fígado, vesícula biliar, estômago, pâncreas, intestino delgado, intestino grosso, rins, vesícula urinária, adrenais, gônadas (ovários ou testículos), medula óssea, sistema nervoso central (cérebro, cerebelo, hipotálamo, tálamo, hipófise, tronco encefálico e medula), assim como de órgãos com alterações macroscópicas identificadas, foram fixados em formalina tamponada a 10% para o exame de histopatologia e imuno-histoquímica (IHQ) de lectinas. Amostras de pulmão foram acondicionadas a -80°C para a realização das análises de qRT-PCR.

#### 4.5 Análises laboratoriais no Laboratório de Pesquisa em Virologia Animal EV- UFMG

##### 4.5.1 Hemaglutinação (HA)

Amostras de referência dos vírus da Influenza A (Tabela 1) foram utilizadas no teste de hemaglutinação para o estabelecimento expresso do título viral de anticorpo neutralizantes, determinado pelo inverso da última diluição onde ocorreu aglutinação das hemácias de peru (concentração 0,8% em PBS 1X) (OMS, 2002).

**Tabela 1:** H1N1pdm09, H1N1hu sazonal e H3N2 utilizados para o estabelecimento do título viral na reação de Hemaglutinação.

Vírus	Estado de origem	Espécie	Ano de coleta	Referência
H1N1pdm09	Minas Gerais	Suíno	2009	Rajão et al., 2013
H1N1hu sazonal	Santa Catarina	Suíno	2013	Costa et al., 2015
H3N2	Paraná	Suíno	2013	Costa et al., 2015

##### 4.5.2 Inibição da Hemaglutinação (HI)

O sangue coletado e acondicionado em tubos com ativador de coágulo durante as capturas de 2021 foi centrifugado por 6 minutos a 4000 rpm em temperatura ambiente, imediatamente após chegada à Escola de Veterinária da UFMG, para obtenção do soro.

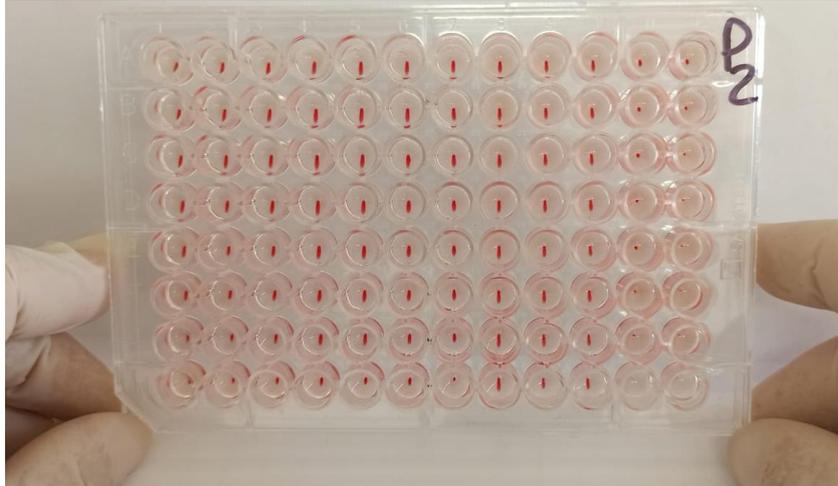
Através da técnica de HI, as amostras de soro dos anos de 2013, 2014, 2018, 2019 e 2021 foram testadas para detectar anticorpos contra os subtipos virais da Influenza A H1N1pdm09, H1N1 humano sazonal e H3N2.

As amostras de soro foram inativadas à temperatura de 56°C, por 30 minutos e foram tratadas, para a remoção de inibidores não específicos da hemaglutinação e aglutininas séricas naturais, como descrito a seguir. Em 200 µl de uma solução de caulim 20% em PBS 1X, foram adicionados à 50 µl de soro inativado e realizada a incubação em temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação a uma velocidade de 2500 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente, 250 µl de uma suspensão de hemácias de peru a 0,5% em PBS 1X, foram adicionados aos soros para incubação a temperatura ambiente por 20 minutos. Ao final, as amostras tratadas foram centrifugadas a uma velocidade de 1500 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente para a transferência do sobrenadante obtido, de diluição 1:10, a um microtubo e estocadas a -20°C.

Em placas de microtitulação com fundo “V” de 96 poços foram adicionados 25 µl de PBS 1X a todos os poços. Na primeira linha (A) foram adicionados 25 µl do soro tratado em cada poço (diluição 1:20) e realizada a diluição seriada por toda a placa na base 2 até a diluição final de 1:2560. Em todos os poços, exceto no controle de soro, foram adicionados 25 µl da suspensão viral com 4 unidades hemaglutinantes do vírus (4 UHA). As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos.

Após este período, 25 µl da suspensão de hemácias de peru a 0,8% em PBS 1X, foram adicionados a todos os poços e realizada a incubação à temperatura ambiente por 30 minutos. Ao final deste período, foi realizada a leitura do teste (Figura 16). A retrotitulação viral foi realizada para a confirmação da quantidade de vírus utilizado na técnica de Hemaglutinação, que deve ser de 4 UHA.

Os títulos de anticorpos de cada amostra foram determinados como o inverso da maior diluição em que não foi observada a hemaglutinação. Títulos iguais ou menores que 20 foram considerados negativos, entre 40 e 80 considerados como títulos baixos, entre 160 e 320 títulos médios e maiores ou iguais a 640 como títulos altos (OMS, 2002).



**Figura 16:** Leitura do resultado da análise de Inibição da Hemaglutinação das amostras de soro coletados de quatis (*Nasua nasua*).

#### 4.5.3 Extração de RNA

A extração do RNA viral foi realizada a partir do kit QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN, BR) (Figura 17) seguindo as recomendações do fabricante. As amostras de *swabs* de orofaringe e retal coletadas em campo no ano de 2021, armazenadas em 3 ml de PBS 1X suplementado com 1% de uma solução de penicilina (200 µl /mL) e estreptomicina (200 µg/mL), foram homogeneizadas usando um vórtex por 15 segundos sob agitação máxima e armazenadas a -80°C.

Os fragmentos de pulmão coletados durante as necropsias foram macerados com almofariz e pilão e diluídos na proporção 1:10 em PBS 1X. O sobrenadante foi coletado após centrifugação por 10 min, a 4500g, na temperatura de 4°C e armazenado a -80°C.

Destas amostras, 200 µl de sobrenadante foram utilizados para a realização do protocolo de extração, sendo o RNA extraído armazenado a -80°C.



**Figura 17:** Realização da extração de RNA com utilização do kit QIAamp® MinElute® Virus Spin Kit (QIAGEN, BR) a partir de amostras de *swabs* de orofaringe de quatis (*Nasua nasua*).

#### 4.5.4 RT-PCR em tempo real

A reação de RT-PCR em tempo real foi realizada utilizando o Termociclador em Tempo Real QuantStudio 1® Real-Time PCR (THERMO FISHER, BR) (Figura 18) e o kit SuperScript™ III Platinum® One-Step Quantitative Kit (INVITROGEN, BR). Os componentes da reação (Tabela 2) resultaram em um volume final de 12,5 µl, sendo utilizado 2,5 µl do RNA viral extraído das amostras biológicas que foram adicionados a microplacas de qRT-PCR de 96 poços. Os *primers* e probe (Tabela 3) para a detecção do gene da proteína M da Influenza A foram utilizados de acordo com o protocolo da OMS (2009b). As condições de ciclagem térmica estão descritas na Tabela 4. Foram consideradas amostras positivas, aquelas que amplificaram abaixo de 40 ciclos (Ct) após cruzarem a linha de limiar. Isolados do subtipo H1N1pdm09 coletados em suínos de Minas Gerais no ano de 2009 foram utilizadas como controle positivo da reação (RAJÃO et al., 2013).

**Tabela 2:** Composição do mix de reação

Componentes da reação	1 reação
Mix de reação x2	6.25 ml
Primer InfA FW	1 ml
Primer InfA RV	1 ml
Probe	0.5 ml
Água livre de RNase	0.75 ml
Rox (diluição 1:10)	0.25 ml
SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix	0.25 ml
<b>Volume total</b>	<b>10 ml</b>

**Tabela 3:** Primers e probe utilizados na reação.

Primers e Probe	Sequência (5'>3')	Concentração trabalho (pmols/ ml)
InfA Forward	GACCAATCTTGTCACCTCTGAC	10
InfA Reverse	AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA	10
InfA Probe	[6-FAM]- AGTCCTCGCTCACTGGGC – [BHQ-1]	5

**Tabela 4:** Condições de ciclagem

Transcrição reversa	50°C	30 min
Inativação RT/ Taq ativação	95°C	2 min
Amplificação PCR (45 ciclos)	95°C	15 seg
	55°C	30 seg*

\* Os dados de fluorescência (FAM) foram coletados durante a etapa de incubação a 55°C.



**Figura 18:** Utilização do sistema QuantStudio 1 Real-Time PCR (THERMO FISHER, BR).

#### **4.6 Análises laboratoriais realizadas na Unidade de Histopatologia e IHQ do MULTILAB da EV-UFMG**

##### **4.6.1 Histopatologia**

Após 24 a 36 horas de fixação em formalina tamponada 10%, os tecidos coletados durante a necropsia foram clivados e processados para investigação de lesões atribuídas aos IAVs. Os tecidos foram desidratados em séries decrescentes de etanol, diafanizados, clarificados por xilol e incluídos em parafina.

Posteriormente, os tecidos parafinizados foram seccionados a 4  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo histológico e corados com Hematoxilina e Eosina, para avaliação por microscopia de luz comum (OPTICAM O500R) (LUNA, 1968).

##### **4.6.2 Imuno-histoquímica de lectinas**

Fragmentos de conchas nasais, traqueia e pulmão coletados durante a necropsia foram utilizados para detecção da presença e distribuição de receptores de ácidos siálicos  $\alpha$ -2,6- e  $\alpha$ -2,3, utilizando a técnica de imuno-histoquímica de lectinas.

Blocos de parafina com os tecidos coletados foram seccionados a 4  $\mu\text{m}$  de espessura em micrótomo histológico e preparados em lâminas silanizadas. Estas permaneceram em estufa a 60°C por 30 minutos para serem desparafinizadas e em seguida hidratadas a partir da imersão em séries decrescentes de álcoois e em água destilada.

A etapa de recuperação antigênica foi realizada por calor em solução de tampão-citrato pH 6. As lâminas foram imersas na solução e mantidas em banho-maria à 98°C por uma hora. Em seguida foram retiradas e deixadas em temperatura ambiente por 30 minutos. A etapa do bloqueio da peroxidase endógena foi realizada a partir da diluição de peróxido de hidrogênio 35% em metanol para uma solução final de 10%. Todos os cortes foram cobertos com a solução e mantidos em câmara úmida por 40 minutos em temperatura ambiente.

Para a etapa do bloqueio de ligações inespecíficas, foi utilizado kit de estreptavidina-biotina comercial (DAKO®, BR) por 10 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Em seguida fez-se a diluição das lectinas específicas (*Maackia amurensis*) 10  $\mu\text{g/ml}$  e (*Sambucus nigra*) 15  $\mu\text{g/ml}$ , conforme adaptação de Hall et al. (2008) e Ning et al. (2012). Os cortes analisados para a presença e distribuição de receptores  $\alpha$ -2,3 assim como os cortes de pulmão de galinha (controle positivo) foram cobertos com *Maackia amurensis*. Os cortes analisados para a presença e distribuição de receptores  $\alpha$ -2,6 assim como os cortes de traqueia de suíno (controle positivo) foram cobertos com *Sambucus nigra*. Outras lâminas de pulmão de galinha e traqueia de suíno não receberam as lectinas de modo a serem utilizadas como controle negativo do teste. Todas as lâminas foram mantidas em câmara úmida por 32 minutos em temperatura ambiente.

As etapas do anticorpo secundário ou sistema de detecção também foram realizadas utilizando kit de estreptavidina-biotina comercial (DAKO®, BR) em câmara úmida à temperatura ambiente por 45 e 30 minutos respectivamente. Para a etapa de revelação foi utilizado o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB- DAKO®) em todos os cortes, que foram mantidos em câmara seca por 5 minutos à temperatura ambiente e posteriormente lavados com água destilada. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina. Os cortes então foram desidratados e montados com lamínulas em bálsamo para serem examinados em microscópio de luz comum (OPTICAM O500R).

#### **4.7 Análise estatística**

Os resultados encontrados foram tabulados e submetidos à análise de frequências, seguida de testes qui-quadrado de independência de Pearson e Fisher e post-hoc de Bonferroni (caso o qui-quadrado fosse estatisticamente significativo). Para o post-hoc foram consideradas diferenças estatísticas quando maiores que 2 e menores que -2. A tabulação foi realizada no software Microsoft Excel 365 e as análises no programa Stata MP versão 16.0 (STATA CORP LLC, 2019).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Animais capturados

A distribuição das frequências de classe etária e gênero, referente as amostras de soro dos animais capturados nos anos 2013, 2014, 2018 e 2019 estão presentes nas tabelas 5, 6, 7 e 8.

**Tabela 5:** Distribuição das frequências das amostras de soro do ano de 2013, em relação ao gênero e classe etária de quatis, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Classe etária	2013		Total	
	Machos	Fêmeas	n	%
<b>Infante</b>	1	1	2	7,7
<b>Jovem</b>	1	6	7	26,9
<b>Sub-adulto</b>	0	0	0	0
<b>Adulto</b>	4	13	17	65,4
<b>Total</b>	6	20	26	100

**Tabela 6:** Distribuição das frequências das amostras de soro de quatis do ano de 2014, em relação ao gênero e classe etária, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Classe etária	2014		Total	
	Machos	Fêmeas	n	%
<b>Infante</b>	7	4	11	57,9
<b>Jovem</b>	0	1	1	5,3
<b>Sub-adulto</b>	0	0	0	0
<b>Adulto</b>	2	5	7	36,8
<b>Total</b>	9	10	19	100

**Tabela 7:** Distribuição das frequências das amostras de soro de quatis do ano de 2018, em relação ao gênero e classe etária, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Classe etária	2018		Total	
	Machos	Fêmeas	n	%
<b>Infante</b>	0	0	0	0
<b>Jovem</b>	7	3	10	40
<b>Sub-adulto</b>	6	4	10	40
<b>Adulto</b>	2	3	5	20
<b>Total</b>	15	10	25	100

**Tabela 8:** Distribuição das frequências das amostras de soro de quatis capturados no ano de 2019, em relação ao gênero e classe etária, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Classe etária	2019		Total	
	Machos	Fêmeas	n	%
<b>Infante</b>	0	0	0	0
<b>Jovem</b>	2	5	7	58,3
<b>Sub-adulto</b>	3	0	3	25
<b>Adulto</b>	0	2	2	16,7
<b>Total</b>	5	7	12	100

No ano de 2021 foram realizados 63 procedimentos de coleta de amostras, dos quais 27 foram realizados no período chuvoso (19 - C1) e (8 - C2), e 36 no período seco (25 – C3) e (11 - C4). A distribuição das frequências de classe etária e sexo por período de captura estão presentes na tabela 9.

**Tabela 9:** Distribuição das frequências de captura de quatis (*Nasua nasua*) entre os períodos chuvoso e seco de 2021, de acordo com o gênero e classe etária.

Classe etária	Chuvoso		Seca		Total	
	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	n	%
<b>Infante</b>	9	4	0	0	13	20,6
<b>Jovem</b>	1	1	3	3	8	12,7
<b>Sub-adulto</b>	1	4	3	4	12	19,1
<b>Adulto</b>	0	7	8	15	30	47,6
<b>Total</b>	11	16	14	22	63	100

Entre os 63 procedimentos de coleta de amostras biológicas, 13 foram realizados em animais recapturados. No período chuvoso ocorreram três recapturas de animais previamente amostrados em 2018 e 2019. No período seco, 10 animais foram recapturados provenientes das capturas ocorridas no período chuvoso do mesmo ano (2021). Estes animais foram submetidos novamente a coleta de amostras com o objetivo de observar possíveis variações de resultados em relação às análises anteriormente realizadas.

As capturas ocorreram em todos os pontos selecionados ao longo do PqM e a distribuição de capturas por ponto está descrita na Tabela 10.

**Tabela 10:** Distribuição de captura de quatis (*Nasua nasua*) entre os períodos chuvoso e seco de 2021, em relação ao local de captura no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

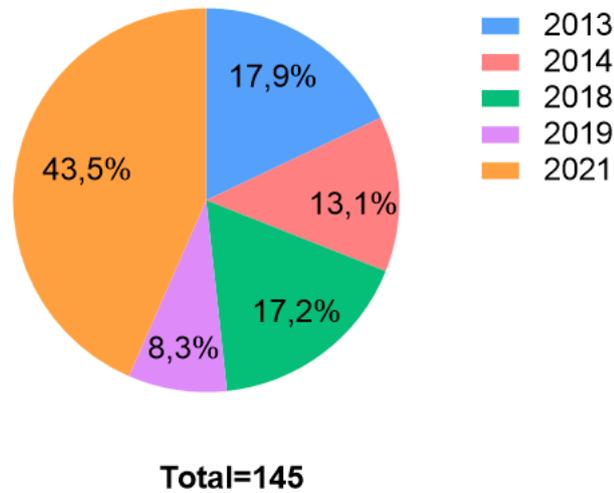
Local	Chuvoso	Seco	Total	
	n	n	n	%
<b>Caraça</b>	19	14	33	52,4
<b>Trilha 12</b>	4	7	11	17,5
<b>Mirante</b>	0	3	3	4,8
<b>Praça das Águas</b>	1	6	7	11,1
<b>Casa de Bonecas</b>	3	6	9	14,2
<b>Total</b>	27	36	63	100

### 5.1.1 Avaliação clínica

No que se refere ao escore corporal, 95,2% (60/63) dos animais apresentaram bom escore e 4,8% (3/63) escore regular. Durante o exame clínico foram encontrados valores médios de 210 bpm, para a frequência cardíaca, 52 mpm, para a frequência respiratória e 38,5°C para a temperatura retal. Durante a avaliação de pele, pelos, hidratação, mucosas, cavidade oral, narinas, olhos, orelhas, linfonodos superficiais e palpação abdominal, apenas 7,9% (5/63) apresentaram linfonodos poplíteos reativos e 7,9% (5/63) apresentaram lesões sugestivas de traumas causados por brigas com outros quatis durante o período reprodutivo. As lesões estavam presentes em narinas, olhos, cavidade oral e em região abdominal. Nenhum animal apresentou alterações na auscultação cardíaca e respiratória.

## 5.2 Reação de Inibição da Hemaglutinação

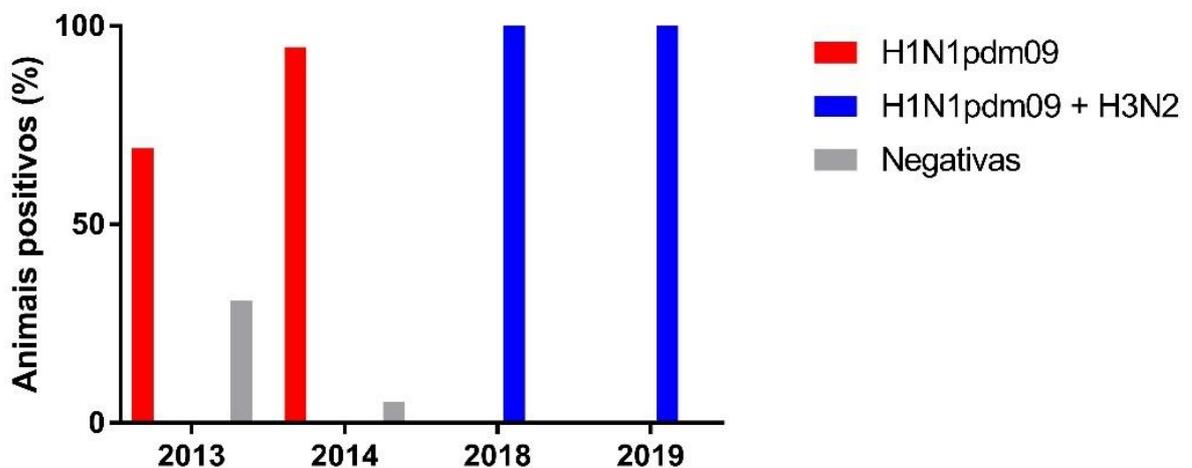
No teste de HI, 145 amostras de soro foram analisadas, 17,9% (26/145) do ano de 2013; 13,1% (19/145) do ano de 2014; 17,2% (25/145) do ano de 2018; 8,3% (12/145) do ano de 2019 e 43,5% (63/145) do ano de 2021 (Figura 19). Todas as amostras foram analisadas para os subtipos H1N1pdm09 e H3N2 enquanto apenas as amostras de 2021 (63/145) foram analisadas para o H1N1hu sazonal.



**Figura 19:** Distribuição das amostras de soro de quatis (*Nasua nasua*), por ano, testadas pela técnica de Inibição da Hemaglutinação.

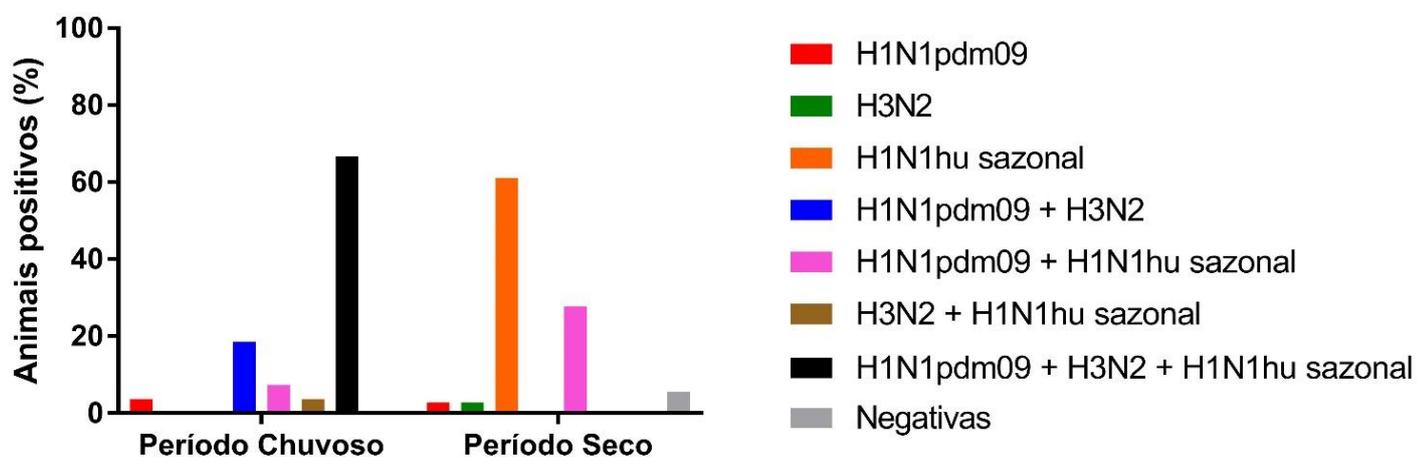
Dentre as amostras analisadas, 92,4% (134/145) foram positivas para IAV, sendo 51,5% (69/134) H1N1pdm09, 41,8% (56/134) H3N2 e 51,9% (28/54) H1N1hu sazonal.

Entre os anos de 2013 e 2014 a ocorrência de IAVs foi somente para o subtipo H1N1pdm09, sendo 69,2% (18/26) em 2013 e 94,7% (18/19) em 2014 (Figura 20). Nos anos de 2018 e 2019, 100% das amostras analisadas foram positivas para coinfeção dos subtipos H1N1pdm09 (25/25) e H3N2 (12/12) (Figura 20).



**Figura 20:** Porcentagem de animais positivos na análise de HI para o subtipo H1N1pdm09 e coinfeção com H3N2, e amostras negativas nos anos de 2013, 2014, 2018 e 2019.

No ano de 2021, 96,8% (61/63) das amostras analisadas foram positivas para IAV. No período chuvoso, 3,7% (1/27) foram positivas apenas para o subtipo H1N1pdm09, enquanto as demais apresentaram-se em coinfeção: 18,5% (5/27) H1N1pdm09 + H3N2; 7,4% (2/27) H1N1pdm09 + H1N1hu sazonal; 3,7% (1/27) H1N1hu sazonal + H3N2 e 66,7% (18/27) H1N1pdm09 + H1N1hu sazonal + H3N2 (Figura 20). No período seco, 2,8% (1/36) das amostras foram positivas para o subtipo H1N1pdm09; 2,8% (1/36) para o H3N2 e 61,1% (22/36) para o H1N1hu sazonal. A coinfeção ocorreu entre os subtipos H1N1pdm09 e H3N2 em uma frequência de 27,8% (10/36). As amostras negativas para IAV representaram 5,6% (2/36) (Figura 21).



**Figura 21:** Porcentagem de animais positivos na análise de HI para os subtipos, H1N1pdm09, H3N2 e H1N1hu sazonal assim como coinfeções e amostras negativas no ano de 2021.

Estatisticamente, foi verificada a existência de associação positiva entre o período chuvoso e animais positivos para os subtipos H1N1pdm09 (teste exato de Fischer,  $p=0,000$ ) e H3N2 (teste exato de Fischer,  $p=0,000$ ). Estes resultados estão apresentados nas tabelas 11 e 12.

Associações em relação ao gênero e classe etária também foram encontradas. Existe associação estatisticamente positiva para animal do sexo masculino (teste exato de Fischer,  $p=0,041$ ) (Tabela 13), sub-adulto (teste exato de Fischer,  $p=0,000$ ) e positividade para o subtipo H3N2 e (Anexo 1) (Figura 22); e para animal adulto e negativo para o subtipo H3N2 (teste exato de Fischer,  $p=0,000$ ) (Anexo 1). Ainda, foi verificada associação positiva entre ser infante e positivo para o subtipo H1N1pdm09 (teste exato de Fischer,  $p=0,000$ ) e entre ser negativo e adulto para o subtipo H1N1pdm09 (teste exato de Fischer,  $p=0,000$ ) (Anexo 2).

**Tabela 11:** Distribuição de frequência do subtipo H1N1pdm09 na população de quatis, em relação ao período do ano de 2021.

Período	H1N1pdm09						Total	
	Positivo			Negativo			n	%
	n	%	Ajuste residual	n	%	Ajuste residual		
Seco	11	17.46	-5.245	25	39.68	5.245	36	57.14
Chuvoso	26	41.27*	5.245	1	1.59	-5.245	27	42.86
Total	37	58.73	-	26	41.27	-	63	100.00

\*Associação significativa no teste exato de Fischer ( $p=0,000$ ) seguido de associação positiva no post-hoc de Bonferroni

para dados não aplicáveis

**Tabela 12:** Distribuição de frequência do subtipo H3N2 na população de quatis, em relação ao período do ano de 2021.

Período	H3N2						Total	
	Positivo			Negativo			n	%
	n	%	Ajuste residual	n	%	Ajuste residual		
Seco	1	1.59	-6.914	35	55.56	6.914	36	57.14
Chuvoso	24	38.10*	6.914	3	4.76	-6.914	27	42.86
Total	25	39.68	-	38	60.32	-	63	100.00

\*Associação significativa no teste exato de Fischer ( $p=0,000$ ) seguido de associação positiva no post-hoc de Bonferroni

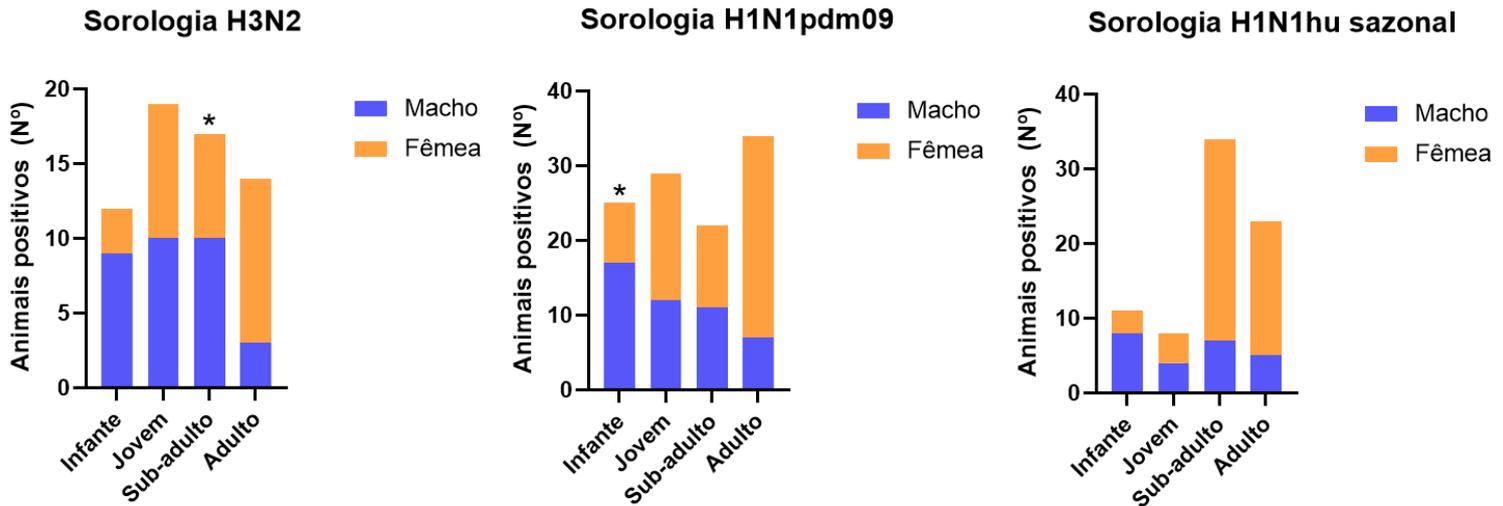
para dados não aplicáveis

**Tabela 13:** Distribuição de frequência do subtipo H3N2 na população de quatis, em relação ao gênero.

Gênero	H3N2						Total	
	Positivo			Negativo			n	%
	n	%	Ajuste residual	n	%	Ajuste residual		
Fêmea	30	20.69	-2.162	55	37.93	2.162	85	58.62
Macho	32	22.07*	2.162	28	19.31	-2.162	60	41.38
Total	62	42.76	-	83	57.24	-	145	100.00

\*Associação significativa no teste exato de Fischer ( $p=0,000$ ) seguido de associação positiva no post-hoc de Bonferroni

para dados não aplicáveis



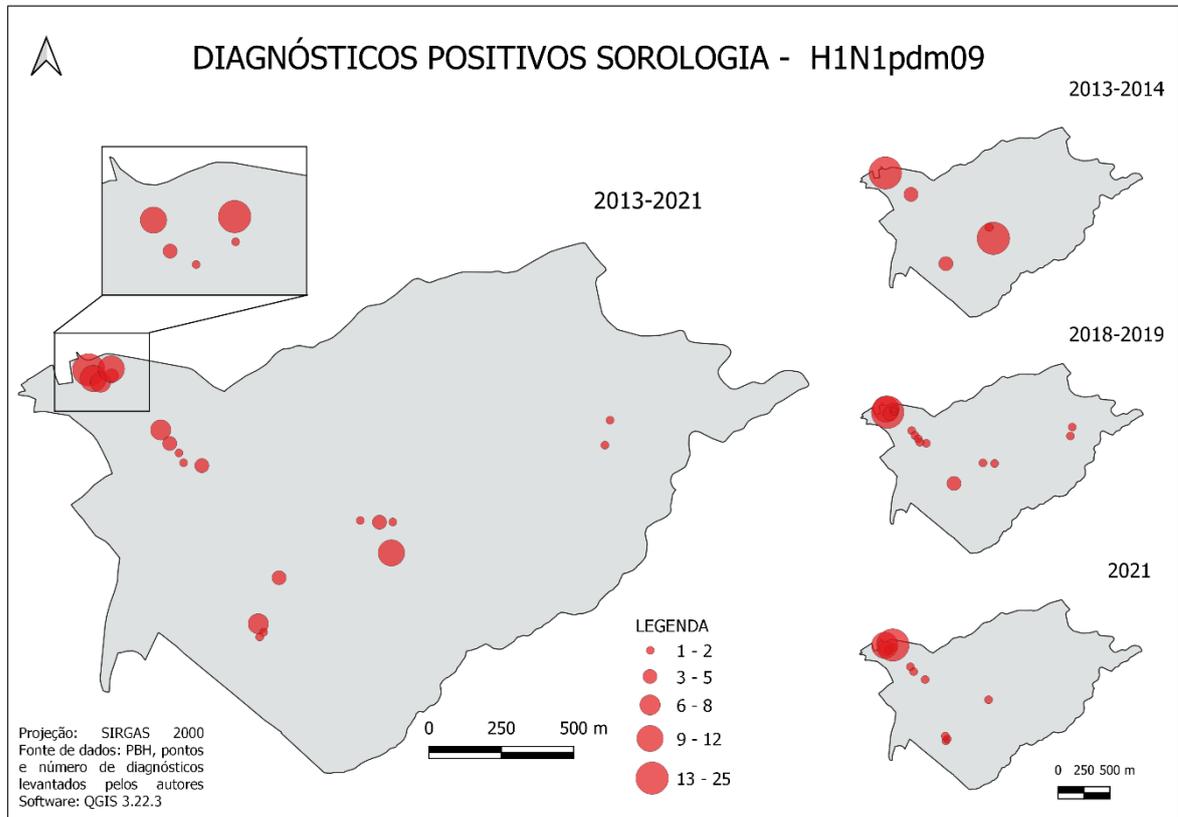
**Figura 22:** Distribuição de quatis (*Nasua nasua*) positivos no teste de HI por subtipo, classe etária e gênero. \*Associação significativa no teste exato de Fischer ( $p < 0,05$ ) seguido de comparação de resíduos padronizados (Anexos 1 e 2)

Os 10 animais recapturados durante as campanhas do ano de 2021 mantiveram positividade sorológica para IAV, as informações sobre esses animais estão presentes na tabela 14.

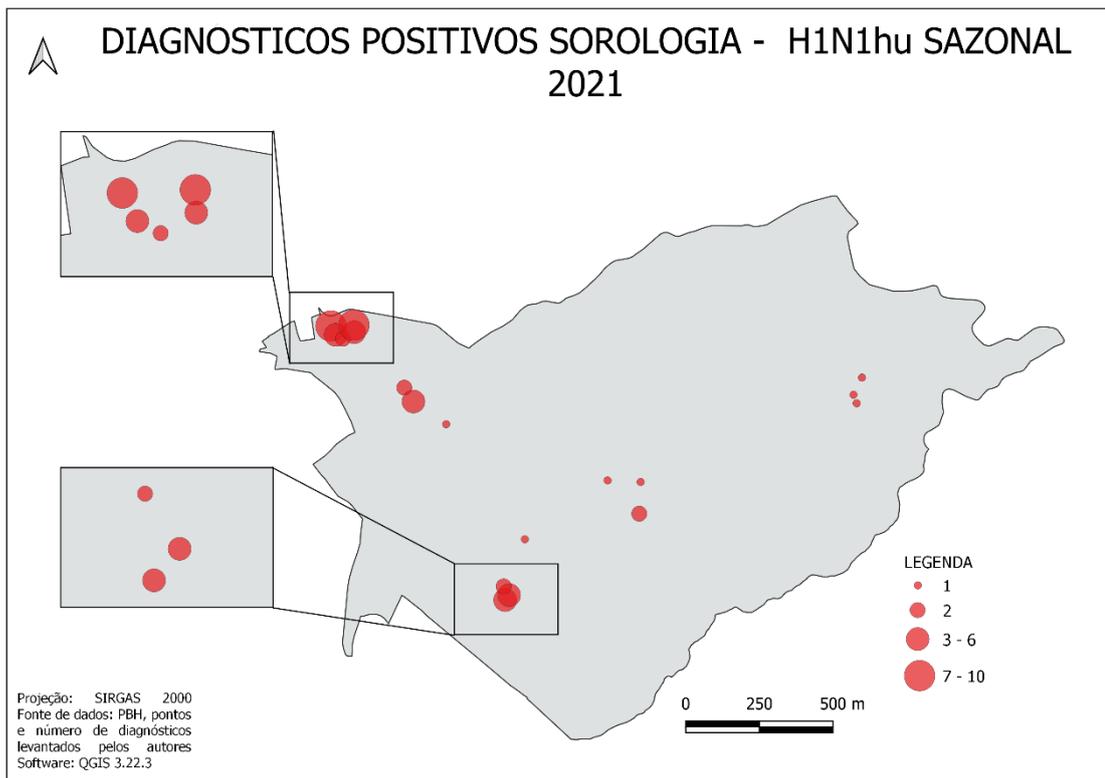
**Tabela 14:** Distribuição do escore de positividade sorológica para os subtipos da Influenza A H1N1 pdm09, H1N1hu sazonal de H3N2 entre os quatis (*Nasua nasua*) recapturados no ano de 2021.

Id	Gênero	Período chuvoso				Período seco			
		Classe etária	Escore H1N1	Escore H3N2	Escore H1N1hu sazonal	Classe etária	Escore H1N1	Escore H3N2	Escore H1N1hu sazonal
521	fêmea	sub-adulto	alto	alto	baixo	adulto	negativo	negativo	alto
522	fêmea	sub-adulto	alto	alto	negativo	adulto	negativo	negativo	alto
523	fêmea	infante	alto	alto	negativo	jovem	negativo	negativo	alto
345	fêmea	jovem	alto	alto	médio	sub-adulto	médio	negativo	alto
526	fêmea	adulto	alto	alto	baixo	adulto	negativo	negativo	alto
346	fêmea	adulto	alto	alto	negativo	adulto	baixo	negativo	alto
531	macho	sub-adulto	médio	baixo	alto	adulto	negativo	negativo	alto
532	fêmea	sub-adulto	médio	baixo	alto	adulto	baixo	negativo	alto
534	macho	infante	alto	baixo	baixo	jovem	baixo	negativo	alto
316	fêmea	adulto	médio	negativo	negativo	adulto	negativo	negativo	alto

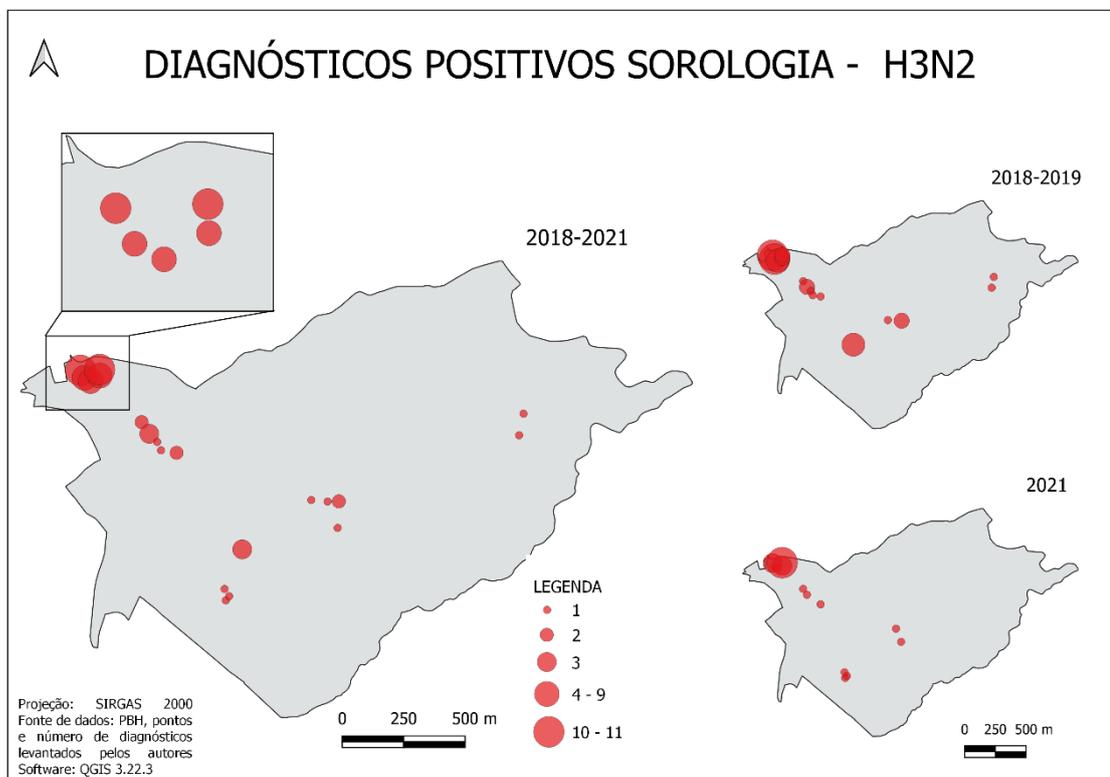
As distribuições de animais positivos na análise de HI, por subtipo viral, regiões do PqM e período de captura estão representadas nas Figuras 23, 24 e 25.



**Figura 23:** Distribuição de quatis (*Nasua nasua*) positivos no teste de HI para o subtipo H1N1pdm09 por ano e local de captura no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.



**Figura 24:** Distribuição de quatis (*Nasua nasua*) positivos no teste de HI para o subtipo H1N1 humano sazonal por ano e local de captura, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.



**Figura 25:** Distribuição de quatis (*Nasua nasua*) positivos no teste de HI para o subtipo H3N2 por ano e local de captura, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

### 5.3 RT-PCR em tempo real

A análise de qRT-PCR foi realizada a partir das amostras biológicas coletadas durante o ano de 2021. Foram testadas amostras coletadas por *swab* de orofaringe (n=63), *swab* retal (n=19), e fragmentos de pulmão (n=3).

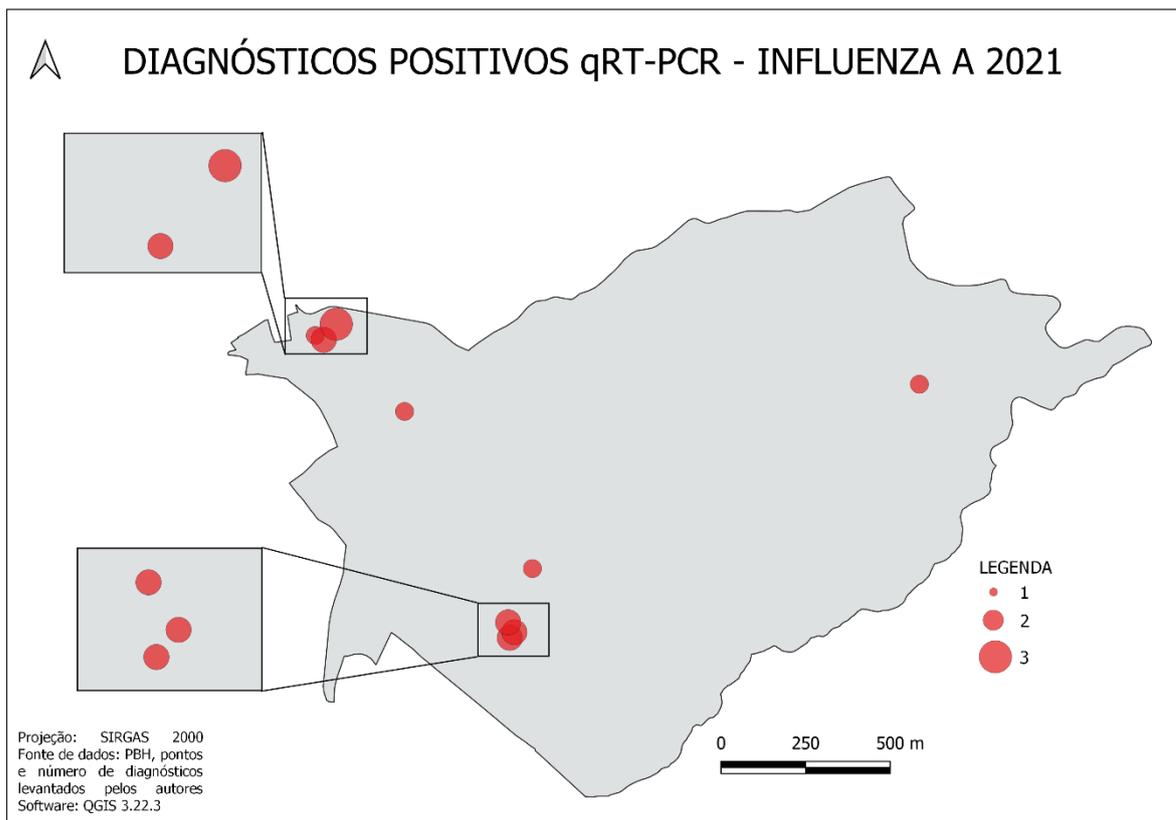
Dentre as amostras analisadas, apenas os *swabs* de orofaringe apresentaram positividade, na porcentagem de 23,81% (15/63). Os animais capturados durante o período seco apresentaram maior frequência de positividade, 60% (9/15). Os machos e os animais adultos apresentaram maior frequência de positividade, 60% (9/15) e 46,7% (7/15), respectivamente. Os valores de Ct variaram entre 34,266 e 39,500 e estão representados na Tabela 14.

As regiões do parque em que foram capturados animais positivos estão representadas na Figura 26. Não foram encontradas associações estatísticas entre ser positivo para IAV e período do ano, gênero e classe etária.

**Tabela 15:** Informações referentes às amostras positivas para IAV na análise de qRT-PCR, 2021.

Data da coleta	Identificação	Sexo	Classe etária	Ct – <i>Swab</i> orofaringe	Ct - <i>Swab</i> retal
18/01/2021	343	fêmea	adulto	36,7	negativo
18/01/2021	344	macho	jovem	37,3	negativo
18/01/2021	516	macho	infante	39,5	negativo
18/01/2021	518	macho	infante	38,3	negativo
18/01/2021	520	macho	jovem	36,6	negativo
19/01/2021	523	fêmea	infante	39.244	negativo
28/06/2021	347	fêmea	sub-adulto	37.776	-*
29/06/2021	538	macho	adulto	39.296	-*
30/06/2021	541	fêmea	adulto	34.266	-*
02/07/2021	534	macho	jovem	39.279	-*
09/07/2021	531	macho	adulto	37.436	-*
12/08/2021	351	fêmea	adulto	39.283	-*
13/08/2021	354	macho	sub-adulto	38.880	-*
13/08/2021	355	fêmea	adulto	38.824	-*
13/08/2021	356	macho	adulto	35.462	-*

\*Análise não realizada



**Figura 26:** Distribuição de quatis (*Nasua nasua*) positivos no teste de RT-PCR para IAV no ano de 2021 e locais de captura, no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Entre os animais recapturados durante as campanhas do ano de 2021, 30% (3/10) apresentaram positividade na análise de qRT-PCR. O animal de identificação 523 (intervalo de capturas = 6 meses) foi positivo somente no período chuvoso e os animais de identificação 531 (intervalo de capturas = 6 meses) e 534 (intervalo de capturas = 6 meses) foram positivos somente no período seco.

#### 5.4 Necropsia

Foram realizadas cinco necropsias de quatis (*Nasua nasua*) durante o ano de 2021. Três destes quatis apresentaram macroscopicamente lesões sugestivas de ataques realizados por cães domésticos, dois foram provenientes de atropelamentos e um resultante de eutanásia realizada posteriormente aos ataques de cães. Destas, dois eram provenientes do período chuvoso e três do período seco.

Não foram encontradas alterações macroscópicas nos pulmões que possibilitasse alguma associação com pneumonia viral e suspeita de infecção pelo vírus da Influenza A.

## 5.5 Histopatologia

Alterações histológicas atribuíveis à infecção pelo vírus da Influenza A não foram encontradas no sistema respiratório dos quatis. O desprendimento de epitélio e presença de autólise foram observados nos órgãos de três animais.

## 5.6 Imuno-histoquímica de lectinas

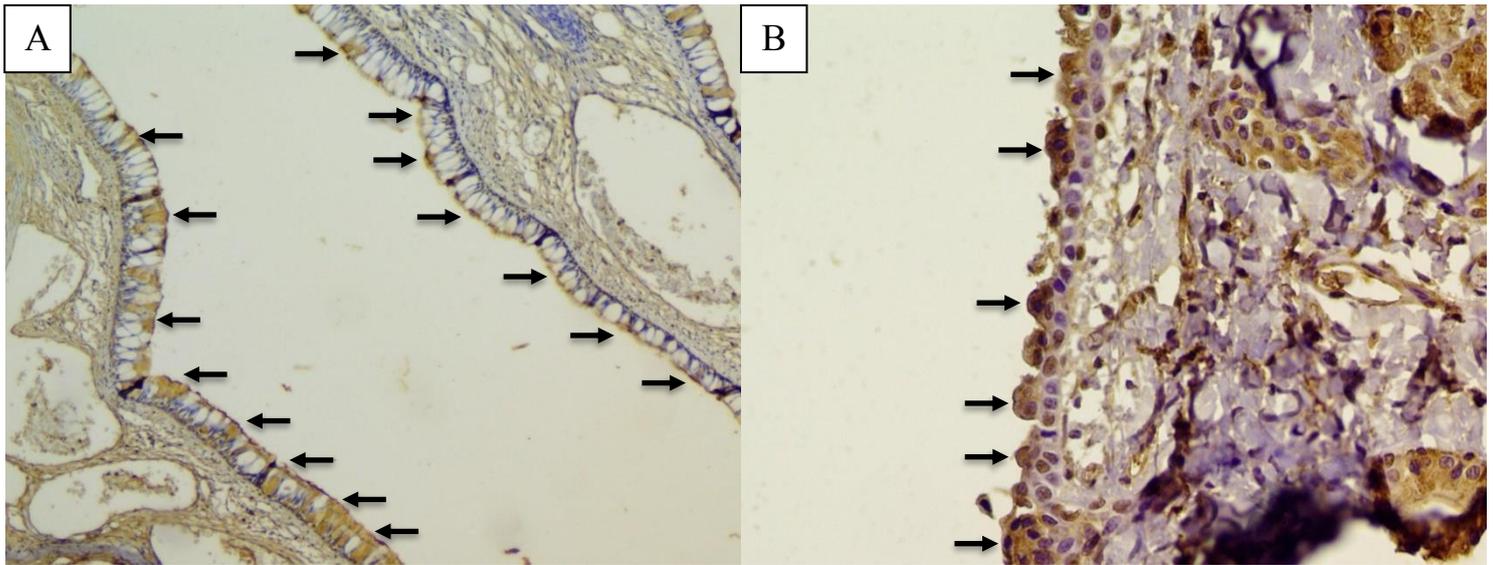
Após a avaliação histológica dos fragmentos de conchas nasais, traqueia e pulmão, os cortes que apresentaram boa preservação, foram selecionados para a realização da técnica de IHQ de lectinas.

A presença de receptores  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6 foram detectados em todos os tecidos provenientes de sistema respiratório analisados (Tabela 15). Estes possuíam distribuição multifocal em epitélio ciliado das conchas nasais (Figura 27) e traqueia (Figuras 28) assim como no epitélio dos brônquios, em pneumócitos e endotélio pulmonar (Figuras 29) dos quatis (*Nasua nasua*).

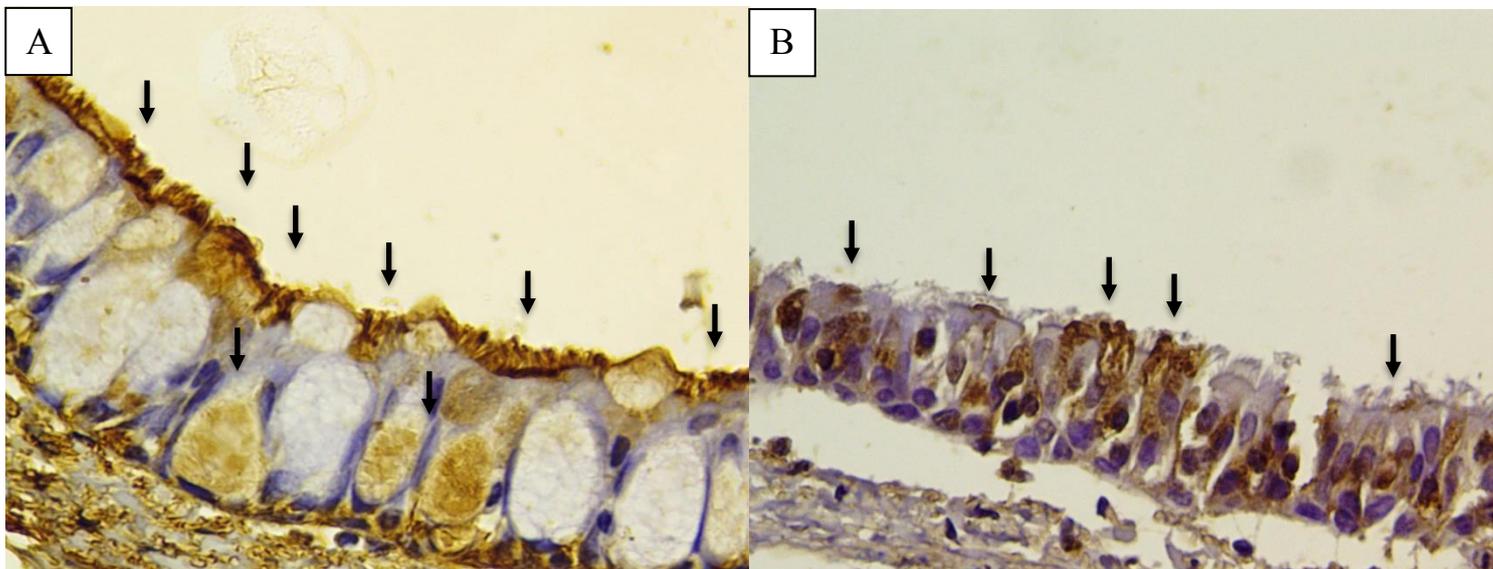
**Tabela 16:** Presença de receptores  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6 em tecidos de quatis (*Nasua nasua*) analisados pela técnica de imuno-histoquímica de lectinas com o uso de *Sambucus nigra* e *Maackia amurensis*.

ID	Concha		Traqueia		Pulmão	
	<i>Sambucus</i>	<i>Maackia</i>	<i>Sambucus</i>	<i>Maackia</i>	<i>Sambucus</i>	<i>Maackia</i>
Q2	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Q3	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	-*	-*
Q4	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo

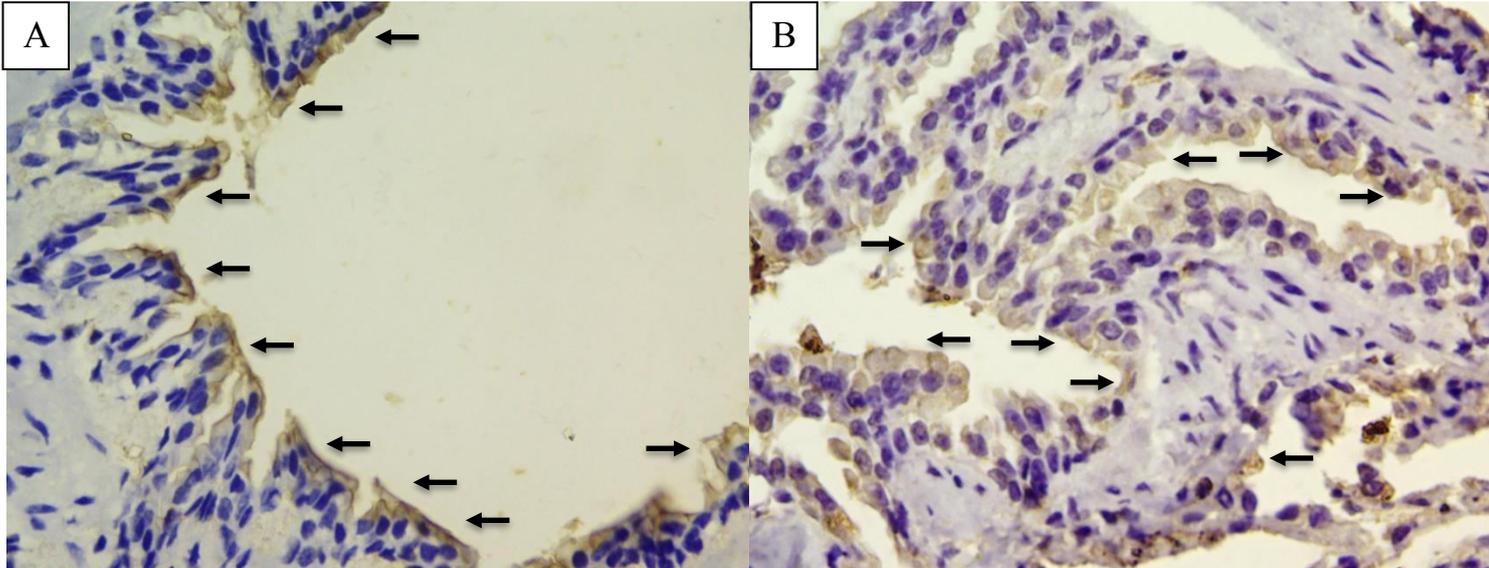
\* Impróprio para análise



**Figura 27:** **A)** Concha nasal de *Nasua nasua* (Q2). As setas indicam reação com a lectina *Maackia amurensis* (SIA  $\alpha$ -2,3). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 10X. **B)** Concha nasal de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Sambucus nigra* (SIA  $\alpha$ -2,6). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 40X.



**Figura 28:** **A)** Traqueia de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Maackia amurensis* (SIA  $\alpha$ -2,3). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X. **B)** Traqueia de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Sambucus nigra* (SIA  $\alpha$ -2,6). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X.



**Figura 29:** **A)** Pulmão de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Maackia amurensis* (SIA  $\alpha$ -2,3). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X. **B)** Pulmão de *Nasua nasua* (Q4). As setas indicam reação com a lectina *Sambucus nigra* (SIA  $\alpha$ -2,6). Contracoloração com hematoxilina e eosina. Revelação com o cromógeno diaminobenzidine (DAB), 60X.

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo relata pela primeira vez a exposição e infecção natural de quatis (*Nasua nasua*) assintomáticos aos vírus da Influenza A e a provável susceptibilidade da espécie a subtipos de origem humana e aviária. Estudos recentes abordando técnicas sorológicas, moleculares e histopatológicas vem demonstrando a susceptibilidade de espécies mesopredadoras a infecções por IAVs em condições naturais e experimentais, essas ocorrem em diversos países, como Estados Unidos, Japão, Canadá e China (HALL et al., 2008; BRITTON et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2014; ROOT et al., 2016; BAKKEN et al., 2020; BAKKEN et al., 2020). No entanto, no Brasil os estudos nessa área ainda são escassos e a participação de mamíferos selvagens em ambiente peridoméstico no ciclo dos vírus da Influenza ainda é desconhecida.

A vigilância de doenças infecciosas na vida selvagem tende a ser, na maioria das vezes, impulsionada por surtos em humanos ou em animais domésticos, com riscos eminentes à saúde pública. Um grande desafio enfrentado na vigilância sistemática de amostras representativas da população silvestre é a necessidade de uma equipe especializada, como também de equipamentos e análises laboratoriais, no qual muitas vezes deixa de ser realizada devido à falta de recursos financeiros e a baixa prioridade diante da ausência de surtos alarmantes (WILLIAMSON; MARROM, 1986; CHILDS, 2004; MATHEWS, 2009).

Neste contexto, estimativas de prevalência de ocorrência de doenças infecciosas nas populações silvestres envolvendo apenas a vigilância passiva de carcaças são mais comumente observadas, quando comparado ao método ativo de capturas de animais silvestres para coleta de amostras biológicas. Apesar da grande importância da vigilância passiva, esta pode apresentar um cenário epidemiológico distorcido, por envolverem principalmente certas classes etárias e/ou populações de animais com a saúde comprometida (JONES et al., 2008). Diante disso, a vigilância ativa associada à passiva, como realizada neste estudo, permite a melhor representatividade amostral, a investigação epidemiológica e a compreensão dos fatores associados a ecologia das coinfeções, envolvendo inclusive animais assintomáticos.

Pessoas infectadas com IAVs podem, por sua vez, constituir uma fonte de infecção para os animais e assim ocorrer o transbordamento viral entre espécies, resultando em eventos de zoonose reversa (SOOKSAWASDI et al., 2021). O Parque Municipal da Mangabeiras favorece a ocorrência desses eventos devido ao intenso contato dos animais com lixo doméstico,

alimentos e água, possivelmente contaminados por humanos. (BROWN, 2000; ROHANI et al., 2009; HEMÉTRIO, 2011).

O cenário epidemiológico do Parque das Mangabeiras sofreu modificações ao longo do período amostrado na presente pesquisa. Nos anos de 2013 e 2014, o contato dos quatis do parque com a população humana estava relacionado à presença de visitantes, que frequentemente interagem com os animais. No entanto, nos anos de 2018 e 2019 a amostragem possivelmente sofreu influência decorrente dos períodos em que o parque esteve fechado para visitação em 2017 e 2018, devido a epidemia de Febre Amarela no Brasil. De forma semelhante, mas por um período ainda maior, o parque esteve fechado por longos meses nos anos de 2020 e 2021 devido a pandemia de Covid-19. Essa alteração na dinâmica de convívio dos quatis com a população humana contribuiu com a modificação comportamental da espécie na região. Foi possível observar a maior presença dos animais em regiões do parque utilizadas para visitação em momentos de abertura, enquanto nos períodos em que esteve fechado, os animais permaneciam preferencialmente nos locais de mata. Um fator em comum entre esses períodos é a visualização frequente dos animais em regiões limítrofes do parque onde ocorre a exposição dos quatis aos rejeitos antrópicos de origem doméstica (dados da administração do PqM).

O esforço amostral obtido representou de forma expressiva a população de quatis presente no PqM, considerando a estimativa populacional realizada por Hemétrio (2011) de 124 animais. A amostragem realizada também envolveu locais do parque com diferentes níveis de influência antrópica, abordando os diferentes desafios enfrentados pela espécie no local. Apesar do deslocamento dos animais ao longo do parque, é possível observar uma maior frequência de captura no ponto “Caraça”, representando 52,4%, dos animais amostrados. Esse resultado pode ser em virtude de os animais utilizarem o local como dormitório e também pela maior presença de descarte de lixo doméstico, utilizado como fonte de alimentação.

Para o estudo soroepidemiológico utilizou-se o teste de inibição da hemaglutinação para a detecção e soroprevalência de anticorpos neutralizantes para os subtipos da Influenza A H1N1pdm09, H1N1 humano sazonal, anterior a pandemia de 2009 e ao H3N2. O teste de HI é amplamente utilizado na vigilância epidemiológica de suínos pelo Brasil e apresenta resultado rápido para as análises (PEDERSEN, 2014). A sua utilização cuidadosa em populações de mamíferos silvestres é alertada por Vandalen et al., (2009), devido a possível presença de inibidores inespecíficos da hemaglutinação contidos nos soros desses animais (OMS 2002). Essa hipótese foi desenvolvida devido ao acúmulo insuficiente de dados referente a espécies de mamíferos selvagens e à análise em questão. Porém, outros estudos utilizando mesopredadores

como modelo experimental executaram o teste de HI com sucesso (HALL et al., 2008; BAKKEN et al., 2020).

De modo a confirmar a confiança das análises sorológicas para IAV em guaxinins, Yamaguchi et al. (2014) comparou as mesmas amostras de soro com diferentes análises, Teste de Precipitação em Agar Gel, Teste de Vírus-Neutralização e Testes de Inibição da Hemaglutinação e da Neuraminidase. Os resultados demonstraram que a técnica de HI não apresentou inconsistência com os demais testes. Devido à proximidade filogenética dos quatis com as espécies envolvidas nestes estudos, o ensaio de HI foi escolhido como de eleição para esta pesquisa (HALL et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2014; BAKKEN et al., 2020).

Os resultados sorológicos obtidos demonstraram que os quatis do PqM são expostos a diferentes subtipos da Influenza A e possuem anticorpos neutralizantes para o agente. A prevalência de anticorpos contra o vírus nos anos estudados foi de 69,2% em 2013; 94,7% em 2014; 100% em 2018 e 2019 e 96,8% em 2021. De forma comparativa, estudos realizados em 630 guaxinins de diferentes cidades do Japão e 730 guaxinins de seis estados dos EUA também investigaram a frequência de animais positivos em análises sorológicas para diferentes subtipos de IAV (HALL et al., 2008; YAMAGUCHI et al., 2014). No entanto a investigação foi decorrente da presença de subtipos de origem aviária e apresentou soroprevalência de 1,89% no Japão e 2,4% nos EUA. Os resultados dessas pesquisas demonstraram que de acordo com as regiões a prevalência sofria alterações, possivelmente relacionada as diferentes realidades apresentadas por cada local. Compreendendo este contexto, a alta prevalência encontrada nos quatis do PqM, pode estar relacionada a alta exposição da espécie aos vírus na região. Assim, novos estudos investigativos em outras regiões devem ser realizados para a melhor compreensão da exposição da espécie ao agente zoonótico.

Os altos títulos de anticorpos neutralizantes encontrados nos quatis, de acordo com os subtipos analisados (51,5% para o H1N1pdm09, 41,8% para o H3N2 e 51,9% para o H1N1hu sazonal) corroboram com os resultados obtidos em guaxinins em outras pesquisas realizadas nos Estados Unidos e Japão (HALL et al., 2008; ROBERTS et al., 2009; ROOT et al., 2010; HORIMOTO et al., 2011; YAMAGUCHI et al., 2014). Porém, a permanência desses anticorpos não foi ser examinada neste estudo e o tempo de infecção nos quatis amostrados não pôde ser estimado. Hall et al. (2008) demonstrou que os anticorpos de guaxinins aos IAVs permanecem por meses na espécie. Em comparação com os quatis, é possível observar que os animais recapturados no ano de 2021 permaneceram positivos na análise sorológica para pelo menos um subtipo de IAV. Assim como os guaxinins, sugere-se que os anticorpos após exposição ao

vírus em quatis também se mantêm detectáveis por meses. Devido ao desconhecimento exato da permanência desses anticorpos na espécie, os achados do presente estudo podem sinalizar uma exposição ao agente em períodos anteriores ao analisado, ou situações de exposição frequente da espécie ao agente.

Em estudo realizado por Monteiro et al (2016), na população humana de 20-59 anos de Belo Horizonte no período de 2011-2013, o subtipo H1N1pdm09 foi detectado em alta prevalência em relação ao H3N2. Em contraste, no ano de 2017 foi relatado um aumento significativo do subtipo H3N2 na população humana em relação a uma ocorrência pouco expressiva do subtipo H1N1pdm09 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022). Estudos sorológicos nas populações de suínos no estado de Minas Gerais entre os anos de 2012 e 2015 demonstraram alta prevalência para o subtipo H1N1pdm09 em relação ao H3N2, indicando que nesses períodos o H1N1pdm09 era endêmico na população suína brasileira (DIAS et al., 2015; FRAIHA, 2017; FRAIHA et al., 2021). No ano de 2018 houve um aumento significativo da circulação do H3N2 na população suína, achado possivelmente relacionado ao intenso contato desses animais com a população humana e a eventos de vacinação, evidenciado pela maior prevalência desse subtipo na população humana no ano anterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022; FRAIHA et al., 2021).

Os resultados encontrados nessa pesquisa apresentaram padrão de prevalência dos subtipos H1N1pdm09 e H3N2 semelhantes aos resultados apresentados nas populações humana e de suínos. Os resultados da população de quatis no período de 2013-2014 apresentam alta prevalência de anticorpos contra o subtipo H1N1pdm09 em relação ao do H3N2, que se tornou presente em coinfeção e alta prevalência no período de 2018-2019. De forma compatível com os achados em suínos, a apresentação desses subtipos na população de quatis possivelmente está relacionada à exposição decorrente da proximidade com a população humana.

Durante o período chuvoso do ano de 2021 foi possível observar uma maior prevalência e associações estatísticas significativas dos subtipos H1N1 pdm09 e H3N2, em relação ao período seco. Esses resultados podem indicar a exposição ao agente durante o período seco, período de maior circulação do agente na população humana, onde a resposta imunológica ao agente estaria sendo desenvolvida e em seguida perceptível durante a amostragem realizada no período chuvoso (KEILMAN, 2019).

Associações entre os animais positivos com a classe etária e gênero também foram encontradas durante as análises estatísticas. A presença de anticorpos foi detectada em todas as classes etárias e gêneros, porém para o subtipo H1N1pdm09 foi verificada associação positiva

entre ser infante e positivo. Essa detecção nesta classe etária pode ter influência da presença de anticorpos maternos transmitidos pelo colostro. Devido a placenta da espécie ser do tipo endotéliocorial, poucos anticorpos são passados aos filhotes durante a gestação e a amamentação se torna um fator importante na defesa imunológica (FAVARON et al., 2014). Apesar dos infantes amostrados neste estudo possuírem idade superior a 4 meses, não é possível descartar a influência da imunidade passiva na análise, fator que pode ter influenciado a relevância estatística observada.

Para o subtipo H3N2 foi encontrada associação estatística positiva entre animais machos e sub-adultos e positivos na análise e os animais adultos em serem negativos. Tais achados podem estar associados com os hábitos dos machos dessa espécie, que ao atingirem a idade adulta, em sua maioria, se tornam solitários e se deslocam por grandes áreas, retornando ao bando, somente no período de acasalamento (HERRERA et al., 2008; COSTA et al., 2009).

Curiosamente, os animais capturados no ano de 2021 foram positivos para o subtipo H1N1 humano sazonal, o qual circulava na população humana entre os anos de 2001 e 2003. Esse subtipo se manteve presente nos períodos chuvoso e seco. A presença do subtipo H1N1hu sazonal também foi detectada em pesquisa sorológica realizada nos EUA em amostras de soro de mesopredadores de vida livre coletadas entre 2009 e 2018 (BAKKEN et al., 2020). Devido a população de quatis do PqM se manter estável desde a década de noventa (dados da administração do PqM) e aos hábitos gregários da espécie que podem favorecer a transmissão intraespecífica, a presença de anticorpos para este subtipo pode sinalizar a ocorrência de exposição da população de quatis do parque durante o período de circulação entre a população humana e posterior manutenção do agente entre os animais.

O vírus Influenza A foi detectado pela RT-PCR durante os dois períodos amostrados do ano de 2021 e identificado apenas nas amostras de *swabs* de orofaringe. Esse dado é condizente com o fato de a influenza ser considerada uma doença primariamente respiratória em mamíferos (BAIGENT; MCCAULEY, 2003) e corroboram os dados encontrados por outros estudos envolvendo guaxinins (HALL et al., 2008).

Os valores de Ct nas amostras positivas variaram entre 34 e 39,5. Embora a carga viral detectada na espécie tenha sido baixa, quando comparada com as cargas virais encontradas em outros mamíferos selvagens, como gambás listrados (*Mephitis mephitis*) e coelhos (*Sylilagus* sp.), os valores encontrados são similares aos encontrados em guaxinins (HALL et al., 2008, HORIMOTO et al., 2011; YAMAGUCHI et al., 2014; ROOT et al., 2014; ROOT et

al., 2016). Estes estudos sugerem que apesar da baixa carga viral, os hábitos comportamentais dos guaxinins (semelhante aos dos quatis) facilitariam eventos de transmissão.

Animais positivos em sorologia e/ou PCR foram capturados em todos os locais selecionados do parque, porém é possível observar uma maior prevalência no ponto de captura “Caraça” e “Praça das Águas”. Estes são considerados os locais do parque em que ocorre maior contato dos animais com a população humana, reforçando a relação da exposição viral com a presença de lixo doméstico. Apesar de realizada a detecção do RNA viral, estudos de subtipagem, isolamento viral e filogenéticos são necessários para a maior compreensão da origem e a participação da espécie no ciclo epidemiológico do agente.

Os resultados dos exames *post mortem* indicaram que os cadáveres dos quatis não apresentavam lesões atribuíveis aos vírus da IAV. Devido aos resultados negativos para a detecção do RNA viral nas amostras de pulmão desses quatis, a ausência de lesões também pode estar relacionada a ausência de infecção. Demais estudos também relacionam guaxinins à quadros de infecção assintomática ao vírus da Influenza, porém, existem alguns relatos de lesões consistentes com os vírus da IAV em necropsias realizadas de gambás listrados (*Mephitis mephitis*) e guaxinins positivos (BRITTON et al., 2010; YAMAGUCHI et al., 2014).

A partir das amostras teciduais obtidas dos quatis do presente estudo, foi possível detectar a presença de receptores SIA  $\alpha$ -2,3 e SIA  $\alpha$ -2,6 no sistema respiratório, assim como ocorre em suínos e guaxinins (HALL et al., 2008). Os receptores apresentaram distribuição multifocal em epitélio respiratório e células caliciformes das conchas nasais e traqueia, e em endotélio pulmonar, epitélio dos brônquios e pneumócitos. A presença de ambos os receptores sugere que a espécie possa ter susceptibilidade aos vírus de origem aviária e humana. Porém, no presente estudo foi avaliada apenas a exposição aos IAVs de origem humana. Esse achado demonstra a importância de maiores investigações quanto a exposição e infecção da espécie aos vírus de origem aviária, que pode ocorrer em regiões onde a ocorrência de aves silvestres migratórias e a criação de aves domésticas são mais presentes.

A participação de uma espécie como “recipiente de mistura” para o vírus envolve múltiplos fatores, os quais não foram abordados em sua totalidade neste estudo, como, a presença de ambos os receptores sugere que a espécie apresenta potencial em ser coinfetada com subtipos virais de diferentes origens, e em condições favoráveis existe a possibilidade de rearranjo genético viral. A principal situação de preocupação em saúde pública envolveria a exposição dos quatis a um agente de origem humana, com subsequentes eventos de deriva

antigênica e posterior reintrodução do vírus mutante na população humana (DAWOOD; SHAW, 2009; VINCENT et al., 2014b).

Devido aos hábitos generalistas e a grande plasticidade alimentar, a população de quatis obteve êxito no PqM e estão presentes em densidades acima do esperado, quando comparadas às densidades populacionais presentes em condições naturais. O aumento da densidade facilita a transmissão de doenças, e estratégias de manejo populacional no local são importantes para a redução dos efeitos negativos desse contexto. A supressão de fontes alimentares de origem antrópica associadas às ações de educação ambiental com a população, assim como o controle populacional direto através de programas de controle reprodutivo são algumas estratégias sugeridas para diminuição da densidade populacional da espécie (PRANGE et al., 2003; HEMÉTRIO, 2011).

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os quatis da espécie *Nasua nasua* são expostos a diferentes subtipos dos vírus da Influenza A no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais;
- A técnica de Inibição da Hemaglutinação se mostrou eficaz para o monitoramento da presença de anticorpos neutralizantes de diferentes subtipos dos vírus IAV na espécie *Nasua nasua*;
- Os quatis possuem capacidade de eliminar RNA viral dos vírus da IAV;
- Os quatis possuem receptores  $\alpha$ -2,3 e  $\alpha$ -2,6 para os vírus IAVs de origem aviária e humana em seu sistema respiratório;
- A susceptibilidade dos quatis aos vírus IAVs torna a espécie uma importante aliada no monitoramento da Influenza A em ambientes silvestres, urbanos e periurbanos.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXANDER, D. J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, v. 74, n. 1–2, p. 3–13, maio 2000.
- ALLISON, A. B. et al. Role of Multiple Hosts in the Cross-Species Transmission and Emergence of a Pandemic Parvovirus. *Journal of Virology*, v. 86, n. 2, p. 865–872, 15 jan. 2012.
- ALLISON, A. B. et al. Host-Specific Parvovirus Evolution in Nature Is Recapitulated by In Vitro Adaptation to Different Carnivore Species. *Plos Pathogens*, v. 10, n. 11, p. e1004475, 6 nov. 2014.
- ALMEIDA, L. R. DE et al. *Angiostrongylus minasensis* n. sp.: new species found parasitizing coatis (*Nasua nasua*) in an urban protected area in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 29, n. 1, 2020.
- ALVES-COSTA, C. P. Frugivoria e dispersão de sementes por quatis (Procyonidae: *Nasua nasua*) no Parque nas Mangabeiras, Belo Horizonte, MG. Dissertação Campinas, SP Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, 1998.
- ANGATA, T.; VARKI, A. Chemical Diversity in the Sialic Acids and Related  $\alpha$ -Keto Acids: An Evolutionary Perspective. *Chemical Reviews*, v. 102, n. 2, p. 439–470, 1 fev. 2002.
- BAIGENT, S. J.; MCCAULEY, J. W. Influenza type A in humans, mammals and birds: Determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *BioEssays*, v. 25, n. 7, p. 657–671, jul. 2003.
- BAKKEN, M. A.; NASHOLD, S. W.; HALL, J. S. Serosurvey of Coyotes (*Canis latrans*), Foxes (*Vulpes vulpes*, *Urocyon cinereoargenteus*), and Raccoons (*Procyon lotor*) for Exposure to Influenza a Viruses in the USA. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 56, n. 4, 8 out. 2020.
- BAUM, L. G.; PAULSON, J. C. Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta histochemica. Supplementband*, v. 40, p. 35–8, 1990.
- BEARD, C. W. et al. Serologic procedures. In: Isolation and identification of avian pathogens. American Association of Avian Pathologists, Texas College Station, 1980.
- BEARE, A. S.; WEBSTER, R. G. Replication of avian influenza viruses in humans. *Archives of Virology*, v. 119, n. 1–2, p. 37–42, mar. 1991.
- BEISIEGEL, B. M. Notes on the coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an Atlantic Forest area. *Brazilian Journal of Biology*, v. 61, n. 4, p. 689–692, nov. 2001.
- BISCHOF, R.; ROGERS, D. G. Serologic Survey of Select Infectious Diseases in Coyotes and Raccoons in Nebraska. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 41, n. 4, p. 787–791, out. 2005.
- BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*, v. 26, p. D49–D53, set. 2008.

- BRAWN, J. D.; ROBINSON, S. K.; THOMSON, F. R. The role of disturbance in the ecology and conservation of birds. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, v. 32, p. 251-276, 2001.
- BRITTON, A. P. et al. Pandemic (H1N1) 2009 in Skunks, Canada. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 6, p. 1043–1045, jun. 2010.
- BROOKS, G. F. et al. *Microbiologia Médica*. 26. ed. [s.l].
- BROWN, I. H. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Veterinary Microbiology*, v. 74, n. 1–2, p. 29–46, maio 2000.
- BUCAFUSCO, D. et al. First characterization of a canine parvovirus causing fatal disease in coatis (*Nasua nasua*). *Archives of Virology*, v. 164, n. 12, p. 3073–3079, 25 dez. 2019.
- BUONAVOGLIA, C. et al. Evidence for evolution of canine parvovirus type 2 in Italy. *Journal of General Virology*, v. 82, n. 12, p. 3021–3025, 1 dez. 2001.
- BURGER, J. et al. Metal levels in raccoon tissues: differences on and off the Department of Energy's Savannah River Site in South Carolina. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 74, n. 1, p. 67–84, 2002.
- CÂMARA, E. M. V. C.; LESSA, L. G. Inventário dos mamíferos do Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais., 1994.
- CAMPOS MONTEIRO, C.; NOGUEIRA CAMPOS DEZANET, L.; BARBOZA FRANÇA, E. Monitoramento de vírus respiratórios na região metropolitana de Belo Horizonte, 2011 a 2013. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, n. 2, p. 1–2, jun. 2016.
- CENTRO DE CONTROLE E PREVENÇÃO DE DOENÇAS. Past Seasons Vaccine Effectiveness Estimates, 2011. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/past-seasons-estimates.html>>. Acesso em: 18 fev. 2022.
- CHEN, B. J.; LAMB, R. A. Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT. *Virology*, v. 372, n. 2, p. 221–232, mar. 2008.
- CHEN, J. et al. Structure of the Hemagglutinin Precursor Cleavage Site, a Determinant of Influenza Pathogenicity and the Origin of the Labile Conformation. *Cell*, v. 95, n. 3, p. 409–417, out. 1998.
- CHEN, Q. et al. Vaccine development for protecting swine against influenza virus. *Animal Health Research Reviews*, v. 13, n. 2, p. 181–195, 20 dez. 2012.
- CHILDS, J. E. Zoonotic viruses of wildlife: hither from yon. In: *Emergence and Control of Zoonotic Viral Encephalitides*. Vienna: Springer Vienna, p. 1–11, 2004.
- CHOI, Y. K. et al. Detection and subtyping of swine influenza H1N1, H1N2 and H3N2 viruses in clinical samples using two multiplex RT-PCR assays. *Journal of Virological Methods*, v. 102, n. 1–2, p. 53–59, abr. 2002.
- COSTA, L. M. C. DA; MERCHAN-HAMANN, E. Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos cenários. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, v. 7, n. 1, p. 11–25, mar. 2016.

COSTA, E. M. J. Movimentação, frugivoria e dispersão de sementes por quatis (Procyonidae: *Nasua nasua*) no Parque do Prosa, Campo Grande, Mato Grosso do Sul. Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Mato Grosso do Sul, 2003.

COSTA, EMJ.; MAURO, RA.; SILVA, JSV. Group composition and activity patterns of brown-nosed coatis in savanna fragments, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, n. 4, p. 985–991, nov. 2009.

CRESPO, J. A. Ecología de la comunidad de mamíferos del Parque Nacional de Iguazú, Misiones Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”, Ecología, 1982.

CUMMINGS, T. H. et al. Drug repurposing of dextromethorphan as a cellular target for the management of influenza. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, v. 41, n. 10, p. 796–803, 18 out. 2021.

DA SILVA, M. R. L. et al. A survey of hemoparasites and ectoparasites in *Nasua nasua* Linnaeus, 1766 with a redescription of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 based on morphological and molecular data. *Parasitology Research*, v. 117, n. 7, p. 2159–2169, 7 jul. 2018.

DAVID J. SCHMIDLY; ROBERT D. BRADLEY. *The Texas Mammals*. Austin, TX: University of Texas Press, 2004.

DAWOOD; SHAW. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *New England Journal of Medicine*, v. 360, n. 25, p. 2605–2615, 18 jun. 2009.

DECKER, D. M. Systematics of the coatis, genus *Nasua* (Mammalia, Procyonidae) *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 1991.

DIAS, A. S. et al. Distribution of antibodies against influenza virus in pigs from farrow-to-finish farms in Brazil. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 9, n. 3, p. 161–167, 23 maio 2015.

DOBSON, F. S.; YU, J. Rarity in Neotropical Forest Mammals Revisited. *Conservation Biology*, v. 7, n. 3, p. 586–591, set. 1993.

DUNN, J. J. et al. Sensitivity of Respiratory Virus Culture When Screening with R-Mix Fresh Cells. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 79–82, jan. 2004.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. *Mammals of the Neotropics: the central neotropics. Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. Chicago e Londres, University of Chicago, 1999.

EISFELD, A. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. At the centre: Influenza A virus ribonucleoproteins. *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 28–41, 24 jan. 2015.

EMMONS, L.; HELGEN, K. *The IUCN Red List of Threatened Species 2016, 2016*. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/species/41684/45216227>>. Acesso em: 18 fev. 2022.

- FAVARON, P. O. et al. Placentation and fetal membrane development in the South American coati, *Nasua nasua* (Mammalia, Carnivora, Procyonidae). *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, n. 1, p. 57, 27 dez. 2014.
- FENG, S. et al. Effectiveness of influenza vaccination on influenza-associated hospitalisations over time among children in Hong Kong: a test-negative case-control study. *The Lancet Respiratory Medicine*, v. 6, n. 12, p. 925–934, dez. 2018.
- FITZGERALD, J.; MEANEY, C.; ARMSTRONG, D. *Colorado mammals* Niwot, CO: University Press of Colorado, 1994.
- FLORES, E. F. et al. *Virologia Veterinária: Orthomyxoviridae*. In: Santa Maria: UFSM. 1. ed. [s.l.]. p. 723–742.
- FOUCHIER, R. A. M. et al. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology*, v. 79, n. 5, p. 2814–2822, mar. 2005.
- FRAIHA, A., ET AL. Estudos sorológicos dos subtipos do vírus influenza a suíno circulantes nas regiões sul e sudeste do Brasil no período de 2014 a 2015. XVIII Congresso Nacional da ABRAVES, Goiania, 2017.
- FRAIHA, A. L. S. et al. Swine influenza A virus subtypes circulating in Brazilian commercial pig herds from 2012 to 2019. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 52, n. 4, p. 2421–2430, 28 dez. 2021.
- GABRIEL, G. et al. Differential use of importin- $\alpha$  isoforms governs cell tropism and host adaptation of influenza virus. *Nature Communications*, v. 2, n. 1, p. 156, 18 set. 2011.
- GAMBARYAN, A. et al. Evolution of the receptor binding phenotype of influenza A (H5) viruses. *Virology*, v. 344, n. 2, p. 432–438, jan. 2006.
- GARTEN, R. J. et al. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science*, v. 325, n. 5937, p. 197–201, 10 jul. 2009.
- GATTI, A. et al. Diet of two sympatric carnivores, *Cerdocyon thous* and *Procyon cancrivorus*, in a restinga area of Espírito Santo State, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v. 22, n. 2, p. 227–230, 1 mar. 2006.
- GAYMARD, A. et al. Functional balance between neuraminidase and haemagglutinin in influenza viruses. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 22, n. 12, p. 975–983, dez. 2016.
- GIPSON, P. S. et al. ACCURACY AND PRECISION OF ESTIMATING AGE OF GRAY WOLVES BY TOOTH WEAR. In: *JOURNAL OF WILDLIFE MANAGEMENT*. v. 64(3) p. 752–758.
- GOMPPER, M. E. *Nasua narica*. *Mammalian Species*, n. 487, p. 1, 23 jun. 1995.
- GOMPPER, M. E.; DECKER, D. M. *Nasua nasua*, *Mammalian species*, 1998.
- HALL, J. S. et al. Influenza Infection in Wild Raccoons. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 12, p. 1842–1848, dez. 2008.

HASS, C. C.; VALENZUELA, D. Anti-predator benefits of group living in white-nosed coatis (*Nasua narica*). Behavioral Ecology and Sociobiology, v. 51, n. 6, p. 570–578, 27 maio 2002.

HEMETRIO, N. S. Levantamento Populacional e Manejo de Quatis (PROCYONIDAE: *Nasua nasua*) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, MG., Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

HEMETRIO, N. S. Levantamento populacional de quatis (PROCYONIDAE: *Nasua nasua*) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, MG. Monografia. Universidade Federal de Minas Gerais. 30p, 2007.

HERRERA, H. M. et al. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, n. 11, p. 1133–1139, nov. 2008.

HOELZER, K.; PARRISH, C. R. The emergence of parvoviruses of carnivores. Veterinary Research, v. 41, n. 6, p. 39, 15 nov. 2010.

HORIMOTO, T. et al. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection in Feral Raccoons, Japan. Emerging Infectious Diseases, v. 17, n. 4, p. 714–717, abr. 2011.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Influenza: Lessons from past pandemics, warnings from current incidents. Nature reviews, microbiology, 2005.

HOUSER, K.; SUBBARAO, K. Influenza Vaccines: Challenges and Solutions. Cell Host & Microbe, v. 17, n. 3, p. 295–300, mar. 2015.

HUI, E. K.-W.; NAYAK, D. P. Role of G protein and protein kinase signalling in influenza virus budding in MDCK cells. Journal of General Virology, v. 83, n. 12, p. 3055–3066, 1 dez. 2002.

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES). Virus Taxonomy: 2020 Release, 2020. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>>. Acesso em: 18 fev. 2022

ILVER, D. et al. Bacterium–Host Protein–Carbohydrate Interactions. In: [s.l.]. p. 134–157.

ITOH, Y. et al. In vitro and in vivo characterization of new swine-origin H1N1 influenza viruses. Nature, v. 460, n. 7258, p. 1021–1025, 13 ago. 2009.

JANKE, B. H. Diagnosis of swine influenza Swine Health Prod, 2000.

JOHNSON, N. P. A. S.; MUELLER, J. Updating the Accounts: Global Mortality of the 1918–1920, Influenza Pandemic. Bulletin of the History of Medicine, v. 76, n. 1, p. 105–115, 2002.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. Nature, v. 451, n. 7181, p. 990–993, fev. 2008.

KAPLAN, R. The analysis of perception via preference: A strategy for studying how the environment is experienced. Landscape Planning, v. 12, n. 2, p. 161–176, ago. 1985.

KAUFMANN, J. H. Ecology and social behaviour of the coati, *Nasua narica*, on Barro Colorado Island, Panama, Univ. Calif, Publ. Zool., 1962.

KEILMAN, L. J. Seasonal Influenza (Flu). *Nursing Clinics of North America*, v. 54, n. 2, p. 227–243, jun. 2019.

KOWALSKI, B. et al. Effects of landscape covariates on the distribution and detection probabilities of mammalian carnivores. *Journal of Mammalogy*, v. 96, n. 3, p. 511–521, 22 maio 2015.

KRAMMER, F. et al. Influenza. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, p. 3, 28 dez. 2018.

KRAMMER, F.; PALESE, P. Advances in the development of influenza virus vaccines. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 14, n. 3, p. 167–182, 27 mar. 2015.

KUIKEN, T. et al. Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science*, v. 312, n. 5772, p. 394–397, 21 abr. 2006.

LANDOLT, G. A.; OLSEN, C. W. Up to new tricks – A review of cross-species transmission of influenza A viruses. *Animal Health Research Reviews*, v. 8, n. 1, p. 1–21, 13 jun. 2007.

LANSZKI, J. Feeding habits of stone martens in a Hungarian village and its surroundings. *FOLIA ZOOLOGICA*, 2003.

LENT, H.; FREITAS, J. F. T. DE. Pesquisas helmintológicas realizadas no Estado do Pará: VI. *Acanthocephala*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 33, n. 4, p. 455–459, 1938.

LIM, H. C.; SODHI, N. S. Responses of avian guilds to urbanization in a tropical city. *Land Urban Plann.*, v. 66, p. 199–215, 2004.

LIN, Y. P. et al. Avian-to-human transmission of H9N2 subtype influenza A viruses: Relationship between H9N2 and H5N1 human isolates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 17, p. 9654–9658, 15 ago. 2000.

LORIS, R. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1572, n. 2–3, p. 198–208, 19 set. 2002.

LUNA, L. G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. In: 3. ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

MACHADO FILHO, D. A. Revisão do gênero *Prosthenorchis* Travassos, 1915 (*Acanthocephala*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 48, n. 0, p. 495–544, 1950.

MARZLUFF, J. M. Worldwide urbanization and its effects on birds. In: *Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World*. Boston, MA: Springer US, p. 19–47, 2001.

MATHEWS, F. Chapter 8 Zoonoses in Wildlife. In: [s.l.], p. 185–209.

MERRILL, H. A. CONTROL OF OPOSSUMS, BATS, RACCOONS, AND SKUNKS *Proceedings of the 1st Vertebrate Pest Conference*, 1982.

- MICHELAZZO, M. DE M. Z. et al. Immunohistochemical evidence of canine morbillivirus (canine distemper) infection in coatis (*Nasua nasua*) from Southern Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 67, n. S2, p. 178–184, 20 jul. 2020.
- MILLER, R. W. Urban forestry: planning and managing urban greenspaces. In: 2. ed. New Jersey: Prentice Hal, 1997.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Nota técnica: Influenza, 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/notas-tecnicas/2022/nota-tecnica-31-2022-cgpn-deidt-svs-ms.pdf/view>>. Acesso em: 18 fev. 2022.
- MITNAUL, L. J. et al. Balanced Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Are Critical for Efficient Replication of Influenza A Virus. *Journal of Virology*, v. 74, n. 13, p. 6015–6020, jul. 2000.
- MORAES MFD. Estudos parasitológicos em cães selvagens errantes e carnívoros selvagens generalistas no Parque Nacional do Iguazu, Foz do Iguazu, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Brasil, 2016.
- MOSTAFA, A. et al. Improved dual promotor-driven reverse genetics system for influenza viruses. *Journal of Virological Methods*, v. 193, n. 2, p. 603–610, nov. 2013.
- MÜLLER, K. H. et al. Emerging cellular targets for influenza antiviral agents. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 33, n. 2, p. 89–99, fev. 2012.
- MUNSTER, V. J. et al. Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Virus in Ferrets. *Science*, v. 325, n. 5939, p. 481–483, 24 jul. 2009.
- MURAKAMI, P. S. et al. AN OUTBREAK OF TUBERCULOSIS BY *MYCOBACTERIUM BOVIS* IN COATIS (*Nasua nasua*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 43, n. 2, p. 338–341, jun. 2012.
- MUTHURI, S. G. et al. Effectiveness of neuraminidase inhibitors in reducing mortality in patients admitted to hospital with influenza A H1N1pdm09 virus infection: a meta-analysis of individual participant data. *The Lancet Respiratory Medicine*, v. 2, n. 5, p. 395–404, maio 2014.
- NAKANO-OLIVEIRA, E. Ecologia Alimentar e Área de vida de Carnívoros da Floresta Nacional de Ipanema, Iperó, SP (Carnivora: Mammalia). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Dissertação de Mestrado, 2002.
- NAYAK, D. P.; HUI, E. K.-W.; BARMAN, S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research*, v. 106, n. 2, p. 147–165, dez. 2004.
- NELSON, M. I. et al. Global migration of influenza A viruses in swine. *Nature Communications*, v. 6, n. 1, p. 6696, 27 nov. 2015.
- NEUMANN, G.; NODA, T.; KAWAOKA, Y. Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature*, v. 459, n. 7249, p. 931–939, 14 jun. 2009.
- NICHOLLS, J. M. et al. Evolving complexities of influenza virus and its receptors. *Trends in Microbiology*, v. 16, n. 4, p. 149–157, abr. 2008.

NICHOLSON, K. G.; WOOD, J. M.; ZAMBON, M. Influenza. *The Lancet*, v. 362, n. 9397, p. 1733–1745, nov. 2003.

NOH, J. Y.; KIM, W. J. Influenza Vaccines: Unmet Needs and Recent Developments. *Infection & Chemotherapy*, v. 45, n. 4, p. 375, 2013.

OHMIT, S. E.; MONTO, A. S. Symptomatic Predictors of Influenza Virus Positivity in Children during the Influenza Season. *Clinical Infectious Diseases*, v. 43, n. 5, p. 564–568, set. 2006.

OLIFIERS, N. Life-history and disease ecology of the brown-nosed coati (*Nasua nasua*) and the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in the Brazilian Pantanal.

OLSEN, B. et al. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, v. 312, n. 5772, p. 384–388, 21 abr. 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO Manual on Diagnosis and Surveillance of Animal Influenza Laboratory Procedures, Genebra, Suíça. (Ed. por membros da Rede de Influenza Animal da OMS), 2002. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68026/WHO\\_CDS?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/68026/WHO_CDS?sequence=1)>. Acesso em: 18 fev, 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Pandemic Influenza Preparedness and Response. Disponível em: <[http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44123/9789241547680\\_eng.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44123/9789241547680_eng.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 18 fev. 2022a.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. CDC protocol of realtime RTPCR for influenza A (H1N1), 2009b. Disponível em: <[https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR\\_SwineH1Asay-2009\\_20090430.pdf](https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Asay-2009_20090430.pdf)>. Acesso em: 18 fev. 2022.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza., 2011. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44518/9789241548090_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acesso em: 18 fev. 2022.

PARRISH, C. R. et al. Cross-Species Virus Transmission and the Emergence of New Epidemic Diseases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 72, n. 3, p. 457–470, set. 2008.

PEDERSEN, J. C. Hemagglutination-Inhibition Assay for Influenza Virus Subtype Identification and the Detection and Quantitation of Serum Antibodies to Influenza Virus. In: [s.l: s.n.]. p. 11–25.

PEDERSOLI, J. L. Resultados e relações das plantas no Parque das Mangabeiras, Convênio PMBH/FUNDEP, Relatório final, 1997.

PINE, R. H. Emmons; L. H.; F. Feer. Neotropical Rainforest Mammals a Field Guide. 2nd ed. The University of Chicago Press, Chicago, Illinois, 307 pp., *Journal of Mammalogy*, v. 80, n. 1, p. 304–309, 16 fev. 1999.

PINTO, L. H.; HOLSINGER, L. J.; LAMB, R. A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell*, v. 69, n. 3, p. 517–528, maio 1992.

PINTO, L. H.; LAMB, R. A. The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 14, p. 8997–9000, abr. 2006.

PORFÍRIO, H. C. et al. Viçosa-MG, v.30, n.6.

PRANGE, S.; GEHRT, S. D.; WIGGERS, E. P. Demographic Factors Contributing to High Raccoon Densities in Urban Landscapes. *The Journal of Wildlife Management*, v. 67, n. 2, p. 324, abr. 2003.

RAJÃO, D. S. et al. Diagnosis and clinic-pathological findings of influenza virus infection in Brazilian pigs. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 33, n. 1, p. 30–36, jan. 2013.

REID, A. H. et al. Origin and evolution of the 1918 “Spanish” influenza virus hemagglutinin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 4, p. 1651–1656, 16 fev. 1999.

REPERANT, L. A. et al. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Infection in Red Foxes Fed Infected Bird Carcasses. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 12, p. 1835–1841, dez. 2008a.

REPERANT, L. A. et al. Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Infection in Red Foxes Fed Infected Bird Carcasses. *Emerging Infectious Diseases*, v. 14, n. 12, p. 1835–1841, dez. 2008b.

REWAR, S.; MIRDHA, D.; REWAR, P. Treatment and Prevention of Pandemic H1N1 Influenza. *Annals of Global Health*, v. 81, n. 5, p. 645, 29 mar. 2016.

ROBERTS, N. M.; HENZLER, D. J.; CLARK, L. Serologic Evidence of Avian Influenza (H4N6) Exposure in a Wild-Caught Raccoon. *Avian Diseases*, v. 53, n. 3, p. 455–457, set. 2009.

ROCHA, V. J.; SEKIANA, M. L. Mamíferos do Parque Estadual Mata dos Godoy TOREZAN, J. M. D. (Org.) Londrina Ecologia do Parque Estadual Mata dos Godoy, 2006.

ROGERS, G. N.; PAULSON, J. C. Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, v. 127, n. 2, p. 361–373, jun. 1983.

ROHANI, P. et al. Environmental transmission of low pathogenicity avian influenza viruses and its implications for pathogen invasion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 25, p. 10365–10369, 23 jun. 2009.

ROOT, J. J. et al. Antibody Responses of Raccoons Naturally Exposed to Influenza A Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 8, p. 821–823, out. 2010.

ROOT, J. J. et al. Ecological Routes of Avian Influenza Virus Transmission to a Common Mesopredator: An Experimental Evaluation of Alternatives. *PLoS ONE*, v. 9, n. 8, p. e102964, 15 ago. 2014.

- ROOT, J. J. et al. Experimental infection of peridomestic mammals with emergent H7N9 (A/Anhui/1/2013) influenza A virus: Implications for biosecurity and wet markets. *Virology*, v. 487, p. 242–248, jan. 2016.
- SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. *Virologia Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- SAVARD, J. P. L.; CLERGEAU, P.; MENNECHEZ, G. Biodiversity concepts and urban ecosystems. *Land. Urban Planning*, v. 48, p. 131-142, 2000.
- SCHALLER, G. B. Mammals and their biomass on a Brazilian ranch. *Arquivos de Zoologia*, v. 31, n. 1, p. 1, 25 jul. 1983.
- SCHMIDT, G. D. Revision of the Class Archiacanthocephala Meyer, 1931 (Phylum Acanthocephala), with Emphasis on Oligacanthorhynchidae Southwell et Macfie, 1925. *The Journal of Parasitology*, v. 58, n. 2, p. 290, abr. 1972.
- SCHOLTISSEK, C. et al. The nucleoprotein as a possible major factor in determining host specificity of influenza H3N2 viruses. *Virology*, v. 147, n. 2, p. 287–294, dez. 1985.
- SCHWARZKOPF, M. et al. Sialylation is essential for early development in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 8, p. 5267–5270, 16 abr. 2002.
- SHAO, W. et al. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, n. 8, p. 1650, 7 ago. 2017.
- SHARON, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1760, n. 4, p. 527–537, abr. 2006.
- SHARON, N. Lectins: Carbohydrate-specific Reagents and Biological Recognition Molecules. *Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 5, p. 2753–2764, fev. 2007.
- SHAW, M. L.; PALESE, P. *Orthomyxoviridae*. 6. ed. Filadélfia, PA, EUA. v. 1.
- SHINYA, K. et al. Influenza virus receptors in the human airway. *Nature*, v. 440, n. 7083, p. 435–436, 22 mar, 2006.
- SILVA, R. O. S. et al. Carriage of *Clostridium difficile* in free-living South American coati (*Nasua nasua*) in Brazil. *Anaerobe*, v. 30, p. 99–101, dez. 2014.
- SILVA, R. O. S. et al. ISOLATION AND GENOTYPING OF *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* FROM FREE-LIVING SOUTH AMERICAN COATI (*Nasua nasua*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v. 47, n. 1, p. 333–336, mar. 2016.
- SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 531–569, jun. 2000.
- SOEMA, P. C. et al. Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 94, p. 251–263, ago. 2015.

SONG, M.-S. et al. Evidence of Human-to-Swine Transmission of the Pandemic (H1N1) 2009 Influenza Virus in South Korea. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 48, n. 9, p. 3204–3211, set. 2010.

SOOKSAWASDINA AYUDHYA, S.; KUIKEN, T. Reverse Zoonosis of COVID-19: Lessons From the 2009 Influenza Pandemic. *Veterinary Pathology*, v. 58, n. 2, p. 234–242, 9 mar. 2021.

SOORYANARAIN, H.; ELANKUMARAN, S. Environmental Role in Influenza Virus Outbreaks. *Annual Review of Animal Biosciences*, v. 3, n. 1, p. 347–373, 16 fev. 2015.

SOULÉ, M. E.; BOLGER, D. T.; ALBERTS, A. C. Reconstructed dynamics of rapid extinctions of chaparral-requiring birds in urban habitat islands. *Conservation Biology*, 1988.

SPERA, C. G. et al. Canine parvovirus 2b in fecal samples of asymptomatic free-living South American coatis (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766). *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 3, p. 1399–1403, 14 set. 2020.

STATACORP LLC. Stata Statistical Software: Release 16, College Station STATACORP, 2019.

STEINHAUER, D. A. Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus. *Virology*, v. 258, n. 1, p. 1–20, maio 1999.

STEVENS, J. et al. Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. *Science*, v. 312, n. 5772, p. 404–410, 21 abr. 2006.

STRASSER, P. et al. Recombinant viral sialate-O-acetyl esterases. *Glycoconjugate Journal*, v. 20, n. 9, p. 551–561, 2003.

SUZUKI, Y. et al. Sialic Acid Species as a Determinant of the Host Range of Influenza A Viruses. *Journal of Virology*, v. 74, n. 24, p. 11825–11831, 15 dez. 2000.

SUZUKI, Y. Sialobiology of Influenza: Molecular Mechanism of Host Range Variation of Influenza Viruses. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 3, p. 399–408, 2005.

SWAYNE, D. E.; SUAREZ, D. L. Highly pathogenic avian influenza. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, v. 19, n. 2, p. 463–482, 1 ago. 2000.

SZEREMETA, B.; ZANNIN, P. H. T. A importância dos parques urbanos e áreas verdes na promoção da qualidade de vida em cidades. *Raega - O Espaço Geográfico em Análise*, v. 29, p. 177, 6 dez. 2013.

TAUBENBERGER, J. K. et al. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*, v. 437, n. 7060, p. 889–893, out. 2005.

TAUBENBERGER, J. K.; KASH, J. C. Influenza Virus Evolution, Host Adaptation, and Pandemic Formation. *Cell Host & Microbe*, v. 7, n. 6, p. 440–451, jun. 2010.

TAUBENBERGER, J. K.; MORENS, D. M. Pandemic influenza - including a risk assessment of H5N1. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, v. 28, n. 1, p. 187–202, 1 abr. 2009.

TAUBENBERGER, J. K.; REID, A. H.; FANNING, T. G. The 1918 Influenza Virus: A Killer Comes into View. *Virology*, v. 274, n. 2, p. 241–245, set. 2000.

TEIXEIRA, R. H. F.; AMBROSIO, S. R. Carnivora – Procyonidae (quati, mão-pelada e jupará). In: *Tratado de Animais Selvagens: Medicina Veterinária*. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 961–979, 2014.

TERBORGH, J. et al. *Transitory states in relaxing ecosystems of land bridge islands Tropical forest remnants: ecology, management and conservation of fragmented communities* Chicago The University of Chicago Press, 1997.

THOMPSON, R. C. A. Parasite zoonoses and wildlife: One health, spillover and human activity. *International Journal for Parasitology*, v. 43, n. 12–13, p. 1079–1088, nov. 2013.

THOMPSON, W. W. et al. Estimates of US influenza-associated deaths made using four different methods. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, v. 3, n. 1, p. 37–49, jan. 2009.

TORNER, N. et al. Effectiveness of non-pharmaceutical measures in preventing pediatric influenza: a case–control study. *BMC Public Health*, v. 15, n. 1, p. 543, 9 dez. 2015.

TRAVASSOS, L. Contribuições para o conhecimento da fauna helmintológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 9, n. 1, p. 5–62, 1917.

TRAVASSOS, L. Contribuições para o conhecimento da fauna helminthologica brasileira: XX. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 19, n. 1, p. 31–125, 1926.

TROVATI, R. G. *Monitoramento radiotelemetrico de pequenos e médios carnívoros na area de influência da UHE Luiz Eduardo Magalhães/Lajeado – TO*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

TUMPEY, T. M. et al. A Two-Amino Acid Change in the Hemagglutinin of the 1918 Influenza Virus Abolishes Transmission. *Science*, v. 315, n. 5812, p. 655–659, 2 fev. 2007.

ULRICH, R. S. View Through a Window May Influence Recovery from Surgery. *Science*, v. 224, n. 4647, p. 420–421, 27 abr. 1984.

VAILLANT, L. et al. Epidemiology of fatal cases associated with pandemic H1N1 influenza 2009. *Eurosurveillance*, v. 14, n. 33, 20 ago. 2009.

VANDALEN, K. K. et al. Monitoring exposure to avian influenza viruses in wild mammals. *Mammal Review*, v. 39, n. 3, p. 167–177, jul. 2009.

VARKI, A. Sialic acids as ligands in recognition phenomena. *The FASEB Journal*, v. 11, n. 4, p. 248–255, mar. 1997.

VARKI, A. Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature*, v. 446, n. 7139, p. 1023–1029, 25 abr. 2007.

VEMULA, S. et al. Current Approaches for Diagnosis of Influenza Virus Infections in Humans. *Viruses*, v. 8, n. 4, p. 96, 12 abr. 2016.

- VIEIRA, F. M.; LUQUE, J. L.; MUNIZ-PEREIRA, L. C. Checklist of helminth parasites in wild carnivore mammals from Brazil. *Zootaxa*, v. 1721, n. 1, p. 1, 7 mar. 2008.
- VINCENT, A. et al. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses and Public Health*, v. 61, n. 1, p. 4–17, fev. 2014a.
- VINCENT, A. et al. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses and Public Health*, v. 61, n. 1, p. 4–17, fev. 2014b.
- WAGNER, R. et al. Interdependence of Hemagglutinin Glycosylation and Neuraminidase as Regulators of Influenza Virus Growth: a Study by Reverse Genetics. *Journal of Virology*, v. 74, n. 14, p. 6316–6323, 15 jul. 2000.
- WAN, H.; PEREZ, D. R. Quail carry sialic acid receptors compatible with binding of avian and human influenza viruses. *Virology*, v. 346, n. 2, p. 278–286, mar. 2006.
- WEBSTER, R. G. et al. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, v. 56, n. 1, p. 152–179, mar. 1992.
- WEBSTER, R. G.; KENDAL, A. P.; GERHARD, W. Analysis of antigenic drift in recently isolated influenza A (H1N1) viruses using monoclonal antibody preparations. *Virology*, v. 96, n. 1, p. 258–264, jul. 1979.
- WILLIAMSON MH; MARROM KC. The analysis and modelling of British invasions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, v. 314, n. 1167, p. 505–522, 15 dez. 1986.
- WILSON, I. A.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, v. 289, n. 5796, p. 366–373, jan. 1981.
- WOOD, J. M. et al. Comparison of influenza serological techniques by international collaborative study. *Vaccine*, v. 12, n. 2, p. 167–174, jan. 1994.
- WOOLHOUSE, M. E. J.; TAYLOR, L. H.; HAYDON, D. T. Population Biology of Multihost Pathogens. *Science*, v. 292, n. 5519, p. 1109–1112, 11 maio 2001.
- WRIGHT, P.; WEBSTER, R. *Orthomyxoviruses* Fields, BN e Knipe, DM Eds., *Fields Virology* Filadélfia Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
- WRIGHT, S. J. et al. Poachers Alter Mammal Abundance, Seed Dispersal, and Seed Predation in a Neotropical Forest. *Conservation Biology*, v. 14, n. 1, p. 227–239, fev. 2000.
- WU, W.; AIR, G. M. Binding of influenza virus to sialic acids: viruses rearranged with hemagglutinin A/NWS/33 bind to alpha2,8-linked sialic acid. *Virology*, 2004.
- WU WW; PANTE N. The directionality of nuclear transport of the influenza A genome is driven by the selective exposure of nuclear localization sequences in the nucleoprotein. *Virology*, 2009.
- WYCKOFF, A.; V. K. et al. Preliminary serological survey of selected diseases and movements of feral swine in Texas *Proceedings of the Wildlife Damage Management Conference*, 2005.

XU, R. et al. Functional Balance of the Hemagglutinin and Neuraminidase Activities Accompanies the Emergence of the 2009 H1N1 Influenza Pandemic. *Journal of Virology*, v. 86, n. 17, p. 9221–9232, 1 set. 2012.

YAMADA, S. et al. Biological and Structural Characterization of a Host-Adapting Amino Acid in Influenza Virus. *PLoS Pathogens*, v. 6, n. 8, p. e1001034, 5 ago. 2010.

YAMAGUCHI, E. et al. Prevalence of multiple subtypes of influenza A virus in Japanese wild raccoons. *Virus Research*, v. 189, p. 8–13, ago. 2014.

YANG, Y. et al. The Transmissibility and Control of Pandemic Influenza A (H1N1) Virus. *Science*, v. 326, n. 5953, p. 729–733, 30 out. 2009.

ZEINER, D. et al. California's wildlife Mammals In: California Statewide Wildlife Habitat Relationships System CA, EUA California Department of Fish and Game, Sacramento, 1990.

ZHOU, B. et al. PB2 Residue 158 Is a Pathogenic Determinant of Pandemic H1N1 and H5 Influenza A Viruses in Mice. *Journal of Virology*, v. 85, n. 1, p. 357–365, jan. 2011.

## 9 APÊNDICE

**Apêndice 1:** Distribuição de frequência do subtipo H3N2 na população de quatis, em relação a classe etária.

Classe etária	H3N2						Total	
	Positivo			Negativo			n	%
	n	%	Ajuste residual	n	%	Ajuste residual		
Infante	12	8.28	0.386	14	9.66	-0.386	26	17.93
Jovem	19	23.10	1.958	14	9.66	-1.958	33	22.76
Sub-adulto	17	11.72*	2.804	8	5.52	-2.804	25	17.24
Adulto	14	9.66	-4.108	47	32.41	4.108	61	42.07
Total	62	42.76	-	83	57.24	-	145	100.00

\*Associação significativa no teste exato de Fischer ( $p=0,000$ ) seguido de associação positiva no post-hoc de Bonferroni

~ para dados não aplicáveis

**Apêndice 2:** Distribuição de frequência do subtipo H1N1pdm09, na população de quatis em relação a classe etária.

Classe etária	H1N1pdm09						Total	
	Positivo			Negativo			n	%
	n	%	Ajuste residual	n	%	Ajuste residual		
Infante	25	17.24*	2.669	1	0.69	-2.669	26	17.93
Jovem	29	20	1.836	4	2.76	-1.836	33	22.76
Sub-adulto	22	15.17	1.559	3	2.07	-1.559	25	17.24
Adulto	34	23.45	-4.826	27	18.62	4.826	61	42.07
Total			-			-	145	100.00

\*Associação significativa no teste exato de Fischer ( $p=0,000$ ) seguido de associação positiva no post-hoc de Bonferroni

~ para dados não aplicáveis

## 10 ANEXOS

**Anexo 1:** Licença Sisbio utilizada para a realização das campanhas de captura e coleta de amostras biológicas de quatis (*Nasua nasua*) no Parque Municipal das Mangabeiras no ano de 2021.



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 75831-1	Data da Emissão: 10/08/2020 12:23:00	Data da Revalidação*: 10/08/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Bruna Hermine de Campos	CPF: 125.224.986-14
Título do Projeto: Soroprevalência e detecção de subtipos virais de Influenza A em quatis ( <i>Nasua nasua</i> ) de vida livre no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte ? MG	
Nome da Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais	CNPJ: 17.217.985/0001-04

#### Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Descrição do local	Município-UF	Bioma	Caverna?	Tipo
1	Parque Municipal das Mangabeiras	Belo Horizonte-MG	Cerrado	Não	Fora de UC Federal

#### Atividades

#	Atividade	Grupo de Atividade
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fora de UC Federal
2	Captura de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal
3	Marcação de animais silvestres in situ	Fora de UC Federal

#### Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxon	Qtde.
1	Marcação de animais silvestres in situ	<i>Nasua nasua</i>	-
2	Captura de animais silvestres in situ	<i>Nasua nasua</i>	-
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	<i>Nasua nasua</i>	-

#### Materiais e Métodos

#	Tipo de Método (Grupo taxonômico)	Materiais
1	Amostras biológicas (Carnívoros)	Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Ectoparasita, Fezes, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
2	Método de captura/coleta (Carnívoros)	Armadilha tipo gaiola com atração por iscas (¿Box Trap/Tomahawk/Sherman¿)
3	Método de marcação (Carnívoros)	Brinco, Colar, Microchip, Rádio transmissor externo

#### Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo destino
1	Universidade Federal de Minas Gerais	Laboratório
2	Universidade Federal de Minas Gerais	Laboratório
3	Universidade Federal de Minas Gerais	Laboratório
4	Universidade Federal de Minas Gerais	Laboratório
5	Universidade Federal de Minas Gerais	Laboratório

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0758310120200810

Página 3/5

**Anexo 2:** Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG para a realização das campanhas de captura e coleta de amostras biológicas de quatis (*Nasua nasua*) no Parque Municipal das Mangabeiras, no ano de 2021.



**UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

**Protocolo CEUA:** 158/2020

**Título do projeto:** Soroprevalência e detecção de subtipos virais de Influenza A em quatis (*Nasua nasua*) de vida livre no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte - MG

**Finalidade:** Pesquisa

**Pesquisador responsável:** Marcelo Pires Nogueira de Carvalho

**Unidade:** Escola de Veterinária

**Departamento:** Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

**Situação atual:** [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião on-line do dia 07/12/2020. Validade: 07/12/2020 à 06/12/2025  
Belo Horizonte, 07/12/2020.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG  
[https://aplicativos.ufmg.br/solicite\\_ceua/](https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/)

Universidade Federal de Minas Gerais  
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha  
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005  
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil  
Telefone: (31) 3409-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/ceua](http://www.ufmg.br/bioetica/ceua) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

**Anexo 3:** Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) das amostras biológicas coletadas de quatis (*Nasua nasua*) no Parque Municipal das Mangabeiras.



**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**  
**Cadastro nº A7C0AAF**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	<b>A7C0AAF</b>
Usuário:	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
CPF/CNPJ:	<b>17.217.985/0001-04</b>
Objeto do Acesso:	<b>Patrimônio Genético</b>
Finalidade do Acesso:	<b>Pesquisa</b>

**Espécie**

**Nasua nasua**  
**Influenza**

Título da Atividade: **Soroprevalência, detecção de subtipos virais e da expressão de receptores do vírus da Influenza A em quatis (*Nasua nasua*) de vida livre no Parque Municipal das Mangabeiras, Belo Horizonte – MG**

**Equipe**

<b>Marcelo Pires Nogueira de Carvalho</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Bruna Hermine de Campos</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Jéssica de Souza Joaquim</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Roselene Ecco</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Fabiola de Oliveira Paes Leme</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Camila Stefanie Fonseca de Oliveira</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Erica Azevedo Costa</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>

**Anexo 4:** Continuação do cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) das amostras biológicas coletadas de quatis (*Nasua nasua*) no Parque Municipal das Mangabeiras.

Zélia Inês Portela Lobato

Universidade Federal de Minas Gerais

Parceiras Nacionais

07.276.220/0001-91 / Fundação de Parques Municipais e Zootécnica

Data do Cadastro: 14/04/2021 22:25:17

Situação do Cadastro: Concluído

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 22:25 de 14/04/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
ASSOCIADO - **SISGEN**