

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BOUBA AVIÁRIA EM *MILVAGO CHIMANGO* (CARACARÁ)

LUIZA RIBEIRO DA ROSA¹; LEONARDO CLASEN RIBEIRO²; NADÁLIN YANDRA
BOTTON³; LARIANE DA SILVA BARCELOS⁴; MATHEUS IURI FRÜHAUF⁵;
GILBERTO D'ÁVILA VARGAS⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – luizaribeirovet@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas – leonardo.clasen@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – nadalinyb@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – larianebarcelos@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – matheus.ifruhauf@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – gdavilavargas@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os poxvírus são vírus envelopados que possuem genoma DNA linear de fita dupla com capacidade de se multiplicar no citoplasma celular (BATISTA, 2018). Atualmente, os constituintes da família *Poxviridae* são divididos em duas subfamílias: *Entomopoxvirinae*, que infecta insetos e a subfamília *Chordopoxvirinae* que acomete animais vertebrados e é composta por nove gêneros, sendo um deles o *Avipoxvirus* (ICTV, 2021).

A Bouba Aviária é uma doença causada por um vírus do gênero *Avipoxvirus* (APV) de caráter nodular e proliferativo que acomete tanto aves domésticas como silvestres. Pode se manifestar de duas principais formas: cutânea e diftérica. A forma cutânea, mais comum, é responsável por ocasionar lesões nodulares e espessamento da pele, principalmente em regiões desprovidas de penas, como a região dos olhos, crista, barbelas, patas e ao redor da cloaca (FLORES, 2012). Enquanto a forma diftérica causa lesões internas (placas sobressalentes de coloração amarealada) nas mucosas do trato gastrointestinal superior e respiratório (GIOTIS; SKINNER, 2019).

O diagnóstico clínico é realizado pelo histórico, sinais clínicos e características das lesões, entretanto sua confirmação só ocorre a partir de exames laboratoriais como Histopatológico e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sendo o primeiro considerado padrão ouro para o diagnóstico de Bouba Aviária de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (2008). A técnica de PCR consiste em amplificar sequências de ácido desoxirribonucleico (DNA) *in vitro*, utilizando primers específicos. As vantagens da utilização dessa técnica molecular estão na necessidade de pequenas quantidades de amostras e, por possuir alta sensibilidade e especificidade, oferece resultados confiáveis (LÜSCHOW et al., 2004). Além disso, a amplificação do gene da proteína de núcleo 4b viral de APV por PCR vem sendo utilizada frequentemente como ferramenta molecular para a detecção de AVPs (GHALYANCHILANGEROUDI et al., 2018).

O *Milvago chimango* é uma espécie de ave falconiforme, de rapina e diurna, da família *Falconidae*, que está presente em países da América Latina (BirdLife International, 2018). Altamente gregária, essa ave possui dieta generalista que inclui animais em decomposição e resíduo domiciliar, bem como presas vivas, como ovos e filhotes de outras aves (BIONDI, 2010; MORRISON; PHILLIPS, 2000). Este trabalho tem como objetivo confirmar a infecção de um *Milvago Chimango* por *Avipoxvirus* através da técnica de PCR.

2. METODOLOGIA

Para a elaboração deste trabalho foi utilizada uma amostra de tecido de *Milvago Chimango* com suspeita clínica de Bouba Aviária coletada pelo NURFS – Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre e enviada ao LabVir – Laboratório de Virologia e Imunologia da Universidade Federal de Pelotas, para a confirmação do diagnóstico presuntivo.

Extraiu-se o DNA da amostra a partir de 50 mg de tecido, utilizando o reagente DNAzol® (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, foi realizada a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o DNA extraído. Foi utilizado um par de primers P4b (P4bF-5'-CAGCAGGTGCTAACAAACAA-3' e P4bR-5'-CGGTAGCTAACGCCGAATA-3'), que amplificam um fragmento de 578pb para o gene da proteína de núcleo 4b viral (BINNS et al., 1989; LEE; LEE, 1997). O volume final da reação de PCR foi de 25 µL, contendo uma unidade de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA), 2 µL do DNA extraído e 0,4 µM de cada primer. As condições da PCR para o gene da proteína de núcleo 4b viral estão descritas na Tabela 1. O produto de PCR amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídeo e visualizado em transiluminador UV (100 V, 40 min). Para controle positivo da reação, foi utilizado o DNA de uma vacina comercial para Bouba Aviária (Biovet® Vaxxinova, Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

Tabela 1. Condições de termociclagem (P4b)

| Passos | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------|-------|--------|--------|--------|--------|------|
| Temp.(°C) | 94 °C | 94 °C | 50 °C | 72 °C | 72 °C | 4 °C |
| Tempo (min/seg) | 7 min | 30 seg | 30 seg | 30 seg | 10 min | ∞ |
| Repetições | 1 x | | 40 x | | 1 x | ∞ |

Passos: 1- Desnaturação; 2- Desnaturação; 3- Anelamento; 4- Extensão; 5- Extensão final; 6- Manutenção.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao realizar a PCR, foi possível concluir que o diagnóstico definitivo para a amostra era, de fato, infecção pelo *Avipoxvirus* (Figura 1).

Figura 1: Gel de agarose a 1,5%, com amplicons de 578pb, resultado compatível com *Avipoxvirus*.



Coluna 1: Marcador (100pb); Coluna 2: Controle positivo (vacina comercial para Bouba Aviária); Coluna 3: Amostra *M. Chimango*; Coluna 4: Controle negativo.

A Bouba aviária está sendo frequentemente relatada em aves silvestres e domésticas no Brasil. Em 2018 foi relatado um surto de forma cutânea de poxvirus aviário em perus comerciais em Minas Gerais (FERREIRA et al., 2018). Já em 2019 ocorreu um surto em frangos caipiras, em uma propriedade no município de Alagoa Grande no estado da Paraíba (SOUZA, 2019). No Rio Grande do Sul foi realizado um levantamento epidemiológico (410 amostras) de doenças virais de aves domésticas, no período de 2000-2016 por Hirshmann et al. (2019). Nesse estudo, a quarta doença viral mais detectada foi a Bouba aviária, demonstrando a disseminação do vírus no estado. Em 2021 o Brasil ficou em 3º lugar no ranking mundial de produção de carne de frango (14,329 milhões de toneladas) e em 1º lugar no ranking mundial de exportação da mesma (4,610 milhões de toneladas) (EMBRAPA, 2022), o que enfatiza a necessidade do monitoramento e controle de enfermidades como a Bouba, que provoca prejuízos econômicos no setor avícola.

A transmissão da Bouba Aviária pode ocorrer pelo contato direto entre as aves, através de fômites contaminados, mas principalmente pela picada de insetos como mosquitos, sendo os principais vetores dessa enfermidade o *Aedes aegypti* e o *Culex quinquefasciatus* (MOÇO et al., 2008). O comportamento alimentar desta ave, sua associação a atividades antrópicas, tendência a abordar, explorar e brincar com novos objetos e sua baixa neofobia se comparado a outras aves podem contribuir para que esta espécie seja suscetível a infecção por *Avipoxvirus* (BIONDI, 2020).

São diversas as fontes de contaminação de Bouba Aviária para a espécie *M. chimango*: a ave está presente em áreas urbanizadas, locais que favorecem a ocorrência de mosquitos - principais vetores da Bouba Aviária. Além disso, sua prática de predar ovos e filhotes de outras aves propicia o contato direto entre espécies silvestres e domésticas, o que facilita a transmissão direta do vírus. A alta exposição dos *M. chimango* ao agente da Bouba Aviária, juntamente dos sinais clínicos característicos, são indicativos do diagnóstico, confirmado via PCR.

A vacinação é o melhor método para prevenção da doença e o controle se sucede por medidas de biossegurança, como isolamento das aves infectadas e desinfecção de superfícies expostas as mesmas, além do controle de mosquitos (MOÇO et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

Através da técnica de PCR foi possível identificar a presença de *Avipoxvirus* na amostra utilizada, estabelecendo um diagnóstico definitivo para o caso e concluindo que há circulação de *Avipoxvirus* no Brasil. Diagnosticar casos de Bouba Aviária auxiliam no controle da doença, preservando a fauna silvestre e evitando grandes perdas econômicas no setor de avicultura brasileira, justificando assim a realização do presente trabalho.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, T.G.S. **Caracterização molecular de *Avipoxvirus* isolados de casos clínicos de Bouba Aviária em aves domésticas.** 2018. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Minas Gerais.

- BIONDI, L.M. et al. Social Learning in the Caracara Chimango, *Milvago chimango* (Aves: Falconiformes): an Age Comparison. **Ethology: international journal of behavioural biology**, Plata, p.722-73, 2010.
- BIONDI, L.M. et al. Variation in boldness and novelty response between rural and urban predatory birds: The Chimango Caracara, *Milvago chimango* as study case. **Behavioural Processes**, p.1-13, 2020.
- BINNS, M.M. et al. Analysis of the fowlpoxvirus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. **Virology**, v.170, n.1, p.288-291, 1989.
- BirdLife International. *Phalcoboenus chimango*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, p.1-10, 2018.
- EMBRAPA. **Embrapa Suínos e Aves**. 2022. Acessado em 28 jun. 2022. Online. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas>>.
- FERREIRA, B.C. Outbreak of cutaneous form of avian poxvirus disease in previously pox-vaccinated commercial turkeys. **Pesquisas Veterinárias Brasileiras**. Überlândia, p.417-424, 2018.
- FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012.
- GHALYANCHILANGEROUDI, A. et al. Molecular characterization and phylogenetic analysis of avian pox virus isolated from pet birds and commercial flocks, in Iran. **Slovenian Veterinary Research**, p.213-218, 2018.
- GIOTIS, E.S.; SKINNER, M.A. Spotlight on avian pathology: Fowlpox virus. **Avian pathology**, v.48, n.2, p.87-90, 2019.
- HIRSHMANN, L.C. Risk Factors Associated with the Presence of Viral Diseases in Domestic Poultry in the Southern Region of Rio Grande do Sul, Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**. Dom Pedrito, p.1-9, 2019.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. **Poxviridae**. 2021. Acessado em 28 jun. 2022. Online. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/74/poxviridae>.
- LEE, L.H.; LEE, K.H. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. **Journal of virological methods**, v.63, n.1-2, p.113-119, 1997.
- LÜSCHOW, D. Differentiation of Avian Poxvirus Strains on the Basis of Nucleotide Sequences of 4b Gene Fragment. **AVIAN DIASES**. p. 453-462, 2004.
- MORRISON, J.L.; PHILLIPS, L.M. Nesting habitat and success of the chimango caracara in southern Chile. **The Wilson Ornithological Society**, v.112, n.2, p.225-232, 2000.
- MOÇO, H.F. et al. Bouba Aviária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v.37, n.11, p.1-5, 2008.
- OIE - World Organisation for Animal Health. Fowl pox. In: Office International des Epizooties Terrestrial Manual. p.531-537, 2008.
- SOUSA, R.T. **Bouba cutânea atípica e mista em frangos caipiras vacinados no nordeste brasileiro**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal da Paraíba.
- TRIPATHY, D.N.; REED, W.M. Pox. In: **Diseases of Poultry**. Hoboken: John Wiley & Sons, Cap.10, p. 333–349, 2013.