

DIAGNÓSTICO POSITIVO DE BOUBA AVIÁRIA EM POMBA DOMÉSTICA NO MUNICÍPIO DE PELOTAS, RS- RELATO DE CASO

ISABEL DE ALMEIDA MANCINI¹; AMANDA DE OLIVEIRA BARBOSA²;
LEONARDO CLASEN RIBEIRO²; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER³

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelmancini@outlook.com

²Universidade Federal de Pelotas– barbosa.oamanda@gmail.com

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

³Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A Boubá Aviária, também conhecida como Varíola Aviária, acomete aves, tanto domésticas, quanto selvagens. A doença causa lesões proliferativas na pele, mucosa do trato respiratório superior, boca e esôfago do paciente. O agente causador da enfermidade é um *poxvírus* avícola pertencente ao gênero *avipoxvírus* e família *poxviridae*. (ICTV, 2013). Os *poxvírus* são vírus complexos de DNA fita dupla linear. Quanto à família *poxviridae*, observa-se que há uma divisão em 2 subfamílias, a saber: *Chordopoxvirinae*, formada de 8 gêneros que infectam animais vertebrados (a qual se refere o presente estudo); e *Entomopoxvirinae*, que acomete invertebrados (ICTV, 2013). Uma peculiaridade sobre o gênero *avipoxvírus* é o seu grande tamanho, além de serem um dos poucos vírus com genoma DNA que replicam no citoplasma (TULMAN et al., 2004).

A enfermidade caracteriza-se por ser de baixa transmissibilidade e mortalidade, apresentando 3 formas principais de manifestação clínica: cutânea (ou seca), diftérica (ou úmida) e septicêmica (TRIPATHY e REED, 2013). A primeira ocorre em locais com ausência de penas e a transmissão se dá por meio da picada de ácaros e mosquitos ou, ainda, pelo contato do vírus com uma área de lesão presente no animal. Ocorre, então, a formação de nódulos, pústulas e, posteriormente, crostas, que descamam e completam o ciclo, constituindo a fonte de retransmissão da doença para outros animais. A forma diftérica é menos comum e caracteriza-se pela presença de nódulos caseosos nas estruturas do trato respiratório superior, ocasionando descargas oculares/nasais e dispnéia. Diferentemente, sua transmissão acontece através da ingestão ou inalação de partículas virais espalhadas no ambiente. No que tange à terceira forma, a septicêmica, observa-se maior prevalência em codornas e canários, levando os animais a quadros de pneumonia grave, cianose e óbito após poucos dias (TRIPATHY e REED, 2013).

Como método diagnóstico confirmatório da enfermidade, realiza-se isolamento viral com inoculação em ovos embrionados, ou em cultivos celulares, além de caracterização histopatológica das lesões (BATISTA, 2018). No exame de histopatologia, evidencia-se a hiperplasia do epitélio, com o aparecimento de corpúsculos de inclusão eosinofílicos do tipo A e corpos elementares virais no citoplasma da célula (TRIPATHY e REED, 2013). Por outro lado, a técnica de PCR (reação de cadeia da polimerase), a qual permite a amplificação de sequências do ácido desoxirribonucleico (DNA) *in vitro*, por ter alta sensibilidade e especificidade, seu uso converteu-se em padrão ouro na detecção de *avipoxvírus* (MESQUITA, 2001). Ainda mais recentemente, o diagnóstico molecular de Boubá Aviária utilizando o gene codificante para proteína P4b tem sido amplamente utilizado (GHALYANCHILANGEROUDI et al., 2018).

O presente trabalho demonstra um relato de caso acerca de uma Pomba doméstica (*Columba livia*) encontrada caída no chão nas dependências de um condomínio residencial de Pelotas com suspeita clínica de Boubá Aviária.

2. METODOLOGIA

O animal em questão apresentava apatia, asas caídas, penas arrepiadas e lesões proliferativas ao redor de ambos os olhos (conforme imagem 1). Fragmentos provenientes da pomba suspeita para Boubá Aviária foram coletados, e, após, encaminhados ao Laboratório de Virologia e Imunologia da Faculdade de Veterinária (LabVir), Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), para confirmação do diagnóstico. A amostra foi devidamente identificada e o material foi armazenado a temperatura de -4°C até o momento da extração do DNA.



Imagem 1: *Columbia Livia* apresentando lesões proliferativas em ambos os olhos.

O DNA da amostra foi extraído a partir de 50mg de tecido, utilizando o reagente DNAzol™ (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as recomendações do fabricante. Após isso, o DNA extraído foi submetido a reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo os genes da DNA polimerase e da proteína de núcleo 4b viral, utilizando os pares de primers PPol (GYURANECZ et. al., 2013) e P4b (BINNS et al., 1989), respectivamente. A reação de PCR foi realizada em volumes finais de 25µL, contendo uma unidade de GoTaq® Colorless Master Mix (Promega, Fitchburg, Wisconsin, EUA), 2µL do DNA extraído e 0,4µM de cada primer. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições para o gene da polimerase: 94°C por 7 min, 40 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 1min 20s, com uma extensão final de 72°C por 10 min. Já para o gene da proteína 4b foram utilizadas as seguintes condições: 94°C por 7 min, 40 ciclos de 94°C por 30s, 50°C por 30s e 72°C por 30s, com uma extensão final de 72°C por 10 min. O produto de PCR amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado utilizando Blue Green e visualizado em transiluminador UV após a eletroforese (100V, 40min). Como controle positivo para a reação, foi extraído DNA de uma vacina comercial para Boubá Aviária (Biovet® Vaxxinova, Vargem Grande Paulista, SP, Brazil).

Os produtos da PCR considerados positivos foram purificados com o kit comercial PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Life

Technologies, Carlsbad, CA) e os amplicons foram sequenciados bilateralmente utilizando o BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing. Com o uso do programa Staden (Staden, 1996), as sequências obtidas foram analisadas, e sequências consenso de cada duplicata foram criadas.

Primer	Sequência	Amplicon (pb)
PPol-F	5' GGCTAGTACKCTTATYAAAGG 3'	1007
PPol-R	5' CGTCTCTACGTGTTTCGCT 3'	
P4b-F	5' CAGCAGGTGCTAAACAACAA 3'	578
P4b-R	5' CGGTAGCTTAACGCCGAATA 3'	

Tabela 1 - Primers utilizados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na amostra analisada na PCR, fragmentos de DNA específicos do APV foram detectados, e o sequenciamento confirmou o diagnóstico positivo para a Boubá Aviária.

Sousa 2019 relatou que, nos últimos anos, com novas pesquisas e estudos acerca da doença, foram descobertas novas variantes e formas de infecção de Boubá Aviária, demandando uma maior atenção aos casos incidentes nos municípios, sendo de suma importância atentar as interações epidemiológicas dos avipoxírus com seus vetores e hospedeiros. Van Riper & Forrester (2007) realizaram um levantamento sobre o número de espécies aviárias em que publicações sobre infecção dos APV estavam disponíveis, chegando a um total de 278 espécies abrangendo 20 ordens distintas. Uma atualização deste levantamento realizada por Carulei (2018) encontrou um aumento para 337 espécies dentro de 77 famílias.

Os *Poxvirus* são relativamente resistentes, podendo sobreviver nas descamações de pele, se em condições ambientais favoráveis, por meses ou anos, caracterizando a via de contaminação mecânica da doença. Também pode ser transmitida por via ocular ou respiratória, através de secreções da nasofaringe ou aerossóis provenientes dessas descamações de pele (SOUSA, 2019). Como relatado por Torres et al., 2016, há uma superpopulação de pombos domésticos em diversas cidades brasileiras devido a um desequilíbrio ambiental, somado as favoráveis condições de abrigo e moradia para esses animais, ocasionando uma rápida reprodução da espécie. Com isso, eles se tornam uma fonte de disseminação em potencial do vírus da Boubá Aviária.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a pomba doméstica (*Columbia livia*) encontrada estava infectada pelo vírus da Boubá Aviária, confirmação feita através do método diagnóstico PCR.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BATISTA, T. G. DA S.; MARTINS, N. R. DA S.; GÓMES, S. Y. M. **Caracterização molecular de avipoxvirus isolados de casos clínicos de boubá aviária em aves domésticas**. 2018. Dissertação (mestrado em Ciência Animal)- Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Minas Gerais.

BINNS, M. M.; BOURSNELL M. E.; TOMLEY F. M.; CAMPBELL J. 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.

CARULEI, O. **Genetic and phenotypic analysis of novel South African Avian poxviruses**. 2018. Tese de Doutorado. Faculty of Health Sciences.

FERREIRA, B. C.; DA SILVA, P. L. **Caracterização patológica e molecular do vírus da bouba aviária como contribuição para elaboração de padrão de condenação para carcaças de perus**. 2015. Dissertação (mestrado)- Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal de Uberlândia.

GHALYANCHILANGEROUDI, A; HOSSEINI, H; MORSHED, R. Molecular characterization and phylogenetic analysis of avian pox virus isolated from pet birds and commercial flocks, in Iran. **Slovenian Veterinary Research**, Californ, v. 55, n. 4, 2018.

GYURANECZ, M.; FOSTER J. T.; DÁN A.; IP H. S.; EGSTAND K. F.; PARKER P. G.; HIGASHIGUCHI J. M.; SKINNER M. A.; HOFLE U.; KREIZINGER Z.; DORRESTEIN G. M.; SOLT S.; SÓS E.; KIM Y. J.; UHART M.; PEREDA A.; GONZÁLES-HEIN G.; HIDALGO H.; BLANCO J. M.; ÉRDELYI K. Worldwide phylogenetic relationship of avian poxviruses. **Journal of virology**, Californ, v. 87, n. 9, p. 4938-4951, 2013.

ICTV (2013). **Índice de vírus ICTVdB**. Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org>>. Acesso em: 02.08.2021.

MESQUITA, R. A. ANZAI, E. K., OLIVEIRA, R. N., NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui Odontol Bras**. São Paulo, v. 15, n 4, p. 314–319, dez. 2001.

SOUSA, R. T. **Bouba cutânea atípica e mista em frangos caipiras vacinados no nordeste brasileiro**, 2019. Dissertação- Programa de pós-graduação em ciência animal- Campus Areia PB: Universidade Federal da Paraíba.

TORRES, A. C. D; D'APARECIDA, N. S; HAAS, D. J. Principais zoonoses víricas, fúngicas e parasitárias de aves domésticas e silvestres. **Veterinária em Foco**, Canoas, v. 13, n. 1, 2016.

TRIPATHY, D. N.; REED, W. M Pox. I **Diseases of Poultry**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 364-381.

TULMAN, E. R.; AFONSO, C. L.; LU, Z.; ZSAK, L.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. The Genome of Canarypox Virus. **Journal Of Virology**, Californ, v. 78, n. 1, p. 353–366, 2004.

VAN RIPER III, C.; FORRESTER, D. Avian pox. **Infectious diseases of wild birds**. 2007.