

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

BRUNA CUSTÓDIO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E MOLECULAR DO VÍRUS DA BOUBA AVIÁRIA
COMO CONTRIBUIÇÃO PARA ELABORAÇÃO DE PADRÃO DE CONDENAÇÃO
PARA CARCAÇAS DE PERUS**

**UBERLÂNDIA
JANEIRO/2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383c
2015

Ferreira, Bruna Custódio, 1989-

Caracterização patológica e molecular do vírus da bouba aviária como contribuição para elaboração de padrão de condenação para carcaças de perus / Bruna Custódio Ferreira. - 2015.

62 f. : il.

Orientador: Paulo Lourenço da Silva.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Peru (Ave) - Doenças - Teses. I. Silva, Paulo Lourenço da, 1956. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

CDU: 619

BRUNA CUSTÓDIO FERREIRA

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E MOLECULAR DO VÍRUS DA BOUBA AVIÁRIA
COMO CONTRIBUIÇÃO PARA ELABORAÇÃO DE PADRÃO DE CONDENAÇÃO
PARA CARCAÇAS DE PERUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Paulo Lourenço da Silva

Área de concentração: Produção animal
Linha de pesquisa: Manejo e eficiência de produção dos animais, seus derivados e subprodutos.

**UBERLÂNDIA
JANEIRO/2015**

**CARACTERIZAÇÃO PATOLÓGICA E MOLECULAR DO VÍRUS DA BOUBA AVIÁRIA
COMO CONTRIBUIÇÃO PARA ELABORAÇÃO DE PADRÃO DE CONDENAÇÃO
PARA CARCAÇAS DE PERUS**

Dissertação aprovada para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia (MG) pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 23 de Janeiro de 2015.

Prof. Dr. Paulo Lourenço Silva, UFU/MG

Prof.^a Dr.^a Daise Aparecida Rossi, UFU/MG

Prof.^a Dr.^a Roselene Ecco, UFMG/MG

A melhor família do mundo.

(A minha!)

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida e pela oportunidade de adquirir mais conhecimento na profissão que tanto amo.

Aos meus pais pela vida, educação, carinho, amor e por todo esforço que fizeram pra que eu me tornasse veterinária. A minha mãe Miriam meu agradecimento especial pela enorme paciência nos meus dias de fúria, por ler toda a minha dissertação mesmo sem entender quase nada e por me apoiar de todas as formas possíveis a conseguir mais essa conquista. É muito amor mesmo mãe! Ao meu pai Antonio Carlos (*in memorian*) que mesmo longe há quase oito anos sempre se faz muito presente em cada ensinamento deixado. Amando as plantas, sem saber, ele me ensinou a amar também os animais.

A minha “irmã” Juliana que sempre se confunde entre irmã, mãe e amiga por cuidar de mim tão bem.

Ao meu cunhado Ali por deixar os dias tensos mais leves com suas piadas engraçadas.

Aos meus sobrinhos Arthur e Bianca que me ensinam todo dia lições sábias de amor, carinho e compreensão com o próximo.

A minha melhor surpresa de 2013/14, meu amor, o bonito! Frederico Ribeiro ter encontrado você no caminho foi fundamental para que essa etapa fosse mais leve e mais alegre. Agradeço a sua paciência com as minhas dificuldades e por me incentivar a ser uma pessoa melhor a cada dia que estou ao seu lado.

Aos meus “cãopanheiros” Pithula (*in memorian*), Preto e Preto Júnior agradeço todos os dias o carinho e o “rabinho” abanando faça chuva ou sol. Animais nos ensinam que se pode amar sem esperar algo em troca.

Ao meu querido orientador e amigo Professor Doutor Paulo Lourenço da Silva que me acolheu tão bem e me ensinou que o aprendizado de um mestrado vai muito além de uma dissertação. Com você aprendi a ter mais coragem para enfrentar os desafios da vida.

A Tia Vera Lourenço por sempre me receber tão bem em sua casa por várias vezes, com tanto carinho.

A Professora Doutora Daise Aparecida Rossi pelo empréstimo do LABIO, pela paciência em ouvir minhas angústias e por me incentivar a ser uma pesquisadora de forma tão carinhosa. Você é referência pra todos que trabalham com você!

A Professora Doutora Anna Lima meu agradecimento por me apresentar o mundo da pesquisa. Graças ao seu incentivo que optei por este caminho.

A todos os membros do LABIO ressaltando Gui e Eliane que ouviram pacientemente minhas angústias e me ajudaram imensamente nesse caminho. A Pri pelo carinho e amizade. Sou a integrante adotada desse laboratório mais feliz do mundo por ter amigos como vocês!

As amigas soberanas da avicultura Adriana Garcia e Bia Fonseca pelo incentivo a pesquisa, pelas risadas e pela amizade.

As amigas da vida toda Bruna, Lara, Janaína, Juliana, Jocasta e Marcela que representam todas as outras que não citei (não menos importantes) agradeço a paciência com a minha ausência e pela força quando os problemas ficavam mais difíceis. Quero vocês comigo a vida toda!

A vizinha, Professora Doutora Denise Santana pelas longas conversas me ensinando as ciladas e as alegrias do universo acadêmico. Se eu fosse agrônoma minha orientadora seria você.

A todos os Professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e também a secretária Célia pela disponibilidade em me atender sempre prontamente.

Às Médicas Veterinárias “coleguinhas” Isabella Lourenço Santos e Jocasta Rodrigues Iasbeck pela ajuda na coleta das amostras e ao longo desses dois anos me salvando de todos os tipos possíveis de problemas.

A técnica do Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia Ester Borges pela paciência e disponibilidade em me ensinar as técnicas histológicas.

À Professora Doutora Roselene Ecco, por ter me acolhido tão bem em Belo Horizonte, partilhado seu laboratório e seus conhecimentos decisivos na conclusão deste trabalho.

Ao Médico Veterinário, Mestre em Patologia Animal e amigo Rodrigo de Macedo Couto pela paciência em ensinar as técnicas moleculares e as interpretações mesmo de longe.

Aos Professores Doutor Humberto Eustáquio Coelho e Doutor Marcelo Emílio Beletti pela contribuição no diagnóstico histopatológico.

Ao Serviço de Inspeção Federal do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, regional de Uberlândia, em especial, ao Fiscal Agropecuário Francisco Borges pela imensa colaboração e total apoio na execução deste trabalho. Também por todos os ensinamentos de vida em nossas longas conversas.

A todos os animais utilizados nesta pesquisa, que me propiciaram conhecimento e a busca pela melhoria da produção animal.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa (projeto aprovado sob o número APQ-02283-13).

A CAPES pela bolsa concedida.

Em dois anos muitas pessoas cruzaram meu caminho. Muitas ficaram e várias passaram por um tempo específico, algumas delas nem tem relação direta com o trabalho, mas me transformaram de alguma forma que indiretamente foi repercutida aqui. Então muito provavelmente algumas pessoas importantes podem ter sido esquecidas. A você o meu agradecimento.

Dados curriculares da autora

Bruna Custódio Ferreira – Nascida em Uberlândia, Minas Gerais, em 30 de julho de 1989, filha de Antonio Carlos Ferreira e Miriam Custódio Borges Ferreira. Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia em março de 2007. Entre 2010 e 2011 foi bolsista pelo projeto 578552/2008-6 - Criação do Centro Colaborador de Defesa Agropecuária do Brasil Central fomentado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Concluiu o curso de Medicina veterinária em janeiro de 2013. Em março de 2013 ingressou e iniciou o mestrado acadêmico pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, na área de concentração em produção animal e linha de pesquisa Manejo e eficiência de produção dos animais, seus derivados e subprodutos no qual foi bolsista pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) em outubro de 2013 dedicando-se exclusivamente a atuação como discente e pesquisadora, até o momento atual.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2 - Primeiro surto de boubá aviária em perus de corte previamente vacinados no Brasil

Figura 1a - Hiperplasia do tecido epitelial H&E x20. Figura 1 b – Células com degeneração hidrópica, vacuolização e presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos H&E x20. Figura 1c – Hiperplasia do tecido com grande quantidade de queratina, infiltrado inflamatório margeando o tecido epitelial. H&E 5x. Figura 1 d – Grande quantidade de infiltrado inflamatório H&E 5x. 39

Figura 2 - Produtos da amplificação por PCR do fragmento do gene P4b do vírus da boubá aviária isolados neste estudo. As amostras estão descritas numericamente. Legenda: M, marcador molecular; V controle positivo; N controle negativo. DNA com aproximadamente 600 pares de base..... 40

Figura 3 – Árvore filogenética gerada a partir da sequência concatenada de nucleotídeos dos fragmentos do gene *fpv167* e dividida em três subgrupos. Método: *Neighbor-joining* com análise *bootstrap* de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros..... 41

CAPÍTULO 3 – Elaboração de padrão de condenação para carcaças com boubá aviária

Figura 1- Peru (*Meleagris gallopavo*) com lesões nodulares, cutâneas em áreas desprovidas de penas suspeitas de boubá aviária. Minas Gerais, maio 2013..... 53

Figura 2- Peru, pele. Hiperplasia e alargamento de células do epitélio, infiltrado inflamatório margeando o tecido epitelial. H&E x10.
..... 56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - Primeiro surto de boubá aviária em perus de corte previamente vacinados no Brasil

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento de amostras de boubá aviária.....	36
Tabela 2. Sequências publicadas no <i>GenBank</i> utilizadas para comparação com a estirpe isolada nesse estudo.	38
Tabela 3. Amostras com a presença (P) / ausência (A) do corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (CI) e classificação dos infiltrados inflamatórios.	40
Tabela 4. Mutações presentes na região 540 do gene nas amostras analisadas (P1, P6, P10, P26) e nas sequências <i>Turkeypox</i> , <i>Turkeypox</i> GB 134/01, (subtipo perus) <i>Chickenpox Vaccina Mild Fort Dodge</i> , <i>Chickenpox Vaccina Diftosec Merial</i> , <i>Fowlpox Nobilis Variole MSD</i> , (vacinas) <i>Fowlpox Hungary</i> , <i>Chickenpox CVL 174/4/04</i> e <i>Fowlpox HP</i> (subtipo galinhas). Houve a troca de uma adenina (A) por uma guanina (G).	42

CAPÍTULO 3 – Elaboração de padrão de condenação para carcaças com boubá aviária

Tabela 1. Percentual de condenações totais em perus por “epitelioma contagioso” em frigorífico matadouro em regime de Inspeção Federal em Minas Gerais, de dezembro de 2012 a dezembro de 2013. Fonte: Serviço de Inspeção Federal.....	56
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RIISPOA - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

DNA – Ácido desoxirribonucléico

OIE – World Organisation for Animal Health / Office International des Epizooties

mL – Mililitro

MCA – Membrana Cório Alantóide

ELISA – Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

PCR – Polymerase Chain Reaction

Art. – Artigo

µm – Micrômetro

CEUA – Comitê de Ética na Utilização de Animais

UFU – Universidade Federal de Uberlândia

Kg – Quilograma

h – Hora

UFMG – Universidade Federal de Uberlândia

NaI – Iodeto de sódio

µL – Microlitro

TE – Tris EDTA

nm – Nanômetro

ng – Nanograma

nmol – Nanomol

min – Minuto

rpm – rotações por minuto

BLASTn – Basic Local Alignment Search Tool

H&E – Hematoxilina e Eosina

pb – par de bases

SUMÁRIO

RESUMO	15
ABSTRACT	16
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS	
1.1 Boubá aviária	17
1.2 Poxvírus	17
1.3 <i>Avipoxvírus</i>	18
1.3.1 Sensibilidade e resistência	18
1.3.2 Classificação das estirpes	18
1.3.3 Transmissão	19
1.3.4 Patogênese	19
1.3.5 Aspectos clínicos	20
1.3.5.1 Forma cutânea ou seca	20
1.3.5.2 Forma diftérica ou mucosa	20
1.3.5.3 Forma mista	20
1.3.6 Alterações patológicas	21
1.3.6.1 Lesões macroscópicas	21
1.3.6.2 Lesões microscópicas	21
1.3.7 Diagnóstico	21
1.3.7.1 Histopatologia	22
1.3.7.2 Isolamento do vírus	22
1.3.7.3 Sorologia	22
1.3.7.4 Neutralização de vírus	22
1.3.7.5 Imunodifusão em gel de Agar	23
1.3.7.6 Hemaglutinação passiva	23
1.3.7.7 Imunofluorescência, imunoperoxidase, e ELISA	23
1.3.7.8 Análises Moleculares	24
1.3.8 Diagnóstico diferencial	24
1.3.9 Controle	24
1.3.9.1 Biossegurança	24
1.3.9.2 Vacinação	24
1.10 Imunidade	25

		14
2	Serviço de Inspeção Federal – critérios de inspeção sanitária	25
2.1	RIISPOA	25
2.2	SEÇÃO V - Aves e pequenos animais	26
2.3	Destino da carcaça	26
	REFERÊNCIAS	27
	 CAPÍTULO 2 - Primeiro surto de boubá aviária em perus de corte previamente vacinados no Brasil	
	RESUMO	31
	ABSTRACT.....	32
	INTRODUÇÃO	33
	MATERIAL E MÉTODOS	34
	Coleta das amostras.....	34
	Análise histopatológica e molecular.....	34
	RESULTADOS	38
	DISCUSSÃO	43
	AGRADECIMENTOS	46
	REFERÊNCIAS	46
	 CAPÍTULO 3 – ELABORAÇÃO DE PADRÃO DE CONDENAÇÃO PARA CARCAÇAS COM BOUBA AVIÁRIA	
	RESUMO	50
	ABSTRACT.....	51
	INTRODUÇÃO	52
	MATERIAL E MÉTODOS	54
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
	AGRADECIMENTOS	58
	REFERÊNCIAS	58
	APÊNDICE A	60
	APÊNDICE B	61

RESUMO

Esse estudo descreveu o primeiro surto de boubá aviária no Brasil em perus de corte previamente vacinados e também estabeleceu, na tentativa de auxiliar o Serviço de Inspeção Federal, um padrão de condenação para carcaças apresentando lesões características de boubá aviária. As aves apresentaram lesões cutâneas crostosas macroscópicas sugestivas de boubá aviária na região da cabeça e do pescoço e nenhum sinal clínico adicional foram observados. Os índices de mortalidade no lote não foram alterados. No frigorífico, 30 carcaças foram retiradas da linha de abate para coleta de fragmentos de pele lesionada para sua caracterização e pesquisa do vírus. As amostras foram fixadas em formol, embebidas em parafina, cortadas em seções de 6 µm e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para visualização em microscópio de luz clara. A identificação do agente foi realizada por meio da técnica de PCR convencional com posterior sequenciamento do gene *fpv167*. No exame histopatológico foram observados: hiperqueratose, acantose e degeneração hidrópica; a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (Bollinger) nos queratinócitos foi observada em 46,6% das amostras. A reação de PCR foi positiva para 83,3% das amostras. Com o uso das duas técnicas de diagnóstico foi possível determinar que 93,3% das amostras foram positivas para boubá aviária. No estudo filogenético realizado, as amostras apresentam 100% de identidade entre si sugerindo que o surto ocorreu por uma única estirpe de vírus. O fragmento do gene sequenciado não permitiu a diferenciação entre estirpes de vírus que infectam perus, vacinal ou de galinhas. O vírus da boubá aviária é espécie específica, e não existem relatos sobre sua ocorrência em mamíferos. De acordo com as características macroscópicas e microscópicas das lesões cutâneas, não se justifica a condenação total das carcaças das aves acometidas pelo vírus da boubá aviária, exceto nos casos de caquexia, aspecto repugnante e outros especificados nos regulamentos do SIF. Estudos incluindo o sequenciamento de outros genes são necessários para melhor caracterização viral e podem auxiliar na identificação da origem do agente etiológico responsável pelo surto e suas possíveis fontes.

Palavras chave: *Avipoxvírus*, Fowlpox, Frigorífico, *Meleagris gallopavo*

ABSTRACT

This study described the first outbreak of avian fowlpox in Brazil in previously vaccinated turkeys and also established, in an attempt to help the Federal Inspection Service, a standard of condemnation for carcasses with lesions characteristic of fowlpox. The turkeys had crusted macroscopic lesions on their skin, suggestive of avian fowlpox in the head and neck and no additional clinical signs were observed. The mortality rates in the flock did not change. In the slaughterhouse, 30 carcasses were removed from the slaughter line to collect damaged skin fragments for its characterization and research of the virus. The samples were fixed in formalin, embedded in paraffin, cut into sections of 6 microns and stained with hematoxylin-eosin for viewing in microscope. The agent identification was performed by conventional PCR with subsequent sequencing of the gene *fpv167*. On histopathology were observed: hyperkeratosis, acanthosis and hydropic degeneration; the presence of eosinophilic intracytoplasmic inclusion corpuscles (Bollinger) was observed in keratinocytes in 46.6% of samples. The PCR reaction was positive in 83.3% of samples. Using both diagnostic techniques was determined that 93.3% of the samples were positive for fowlpox. In the phylogenetic study, the samples show 100% of identity to each other suggesting that the outbreak occurred by a single virus strain. The sequenced gene fragment did not allow differentiation between strains of virus that infect turkeys, chickens or vaccinal strain. The fowlpox virus is avian species specific, and there are no reports of its occurrence in mammals. According to the macroscopic and microscopic characteristics of the skin lesions is not justified total condemnation of turkey's carcasses affected by avian fowlpox, except in cases of cachexia, disgusting aspect and other specifications at Federal Inspection Service regulations. Studies including the sequencing of other genes are needed to better viral characterization and can assist in identifying origin of the etiologic agent responsible for the outbreak and its possible sources.

Key words: *Avipoxvirus*, Fowlpox, Slaughterhouse, *Meleagris gallopavo*

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Boubá aviária

Doença viral provocada pelo poxvírus aviário pertencente ao gênero *Avipoxvirus*, é comum em aves comerciais, de estimação e selvagens (TRIPATHY; REED, 1998; TRIPATHY; REED, 2008). Dentro do gênero *Avipoxvirus* existem atualmente apenas 10 espécies definidas com nomes originalmente atribuídos de acordo com as espécies de aves que infectam ou a partir do qual eles foram isolados (ICTV, 2013). Novos isolados continuam a ser identificados em novas espécies como os detectados em flamingo (*Phoenicopterus minor*) (ZIMMERMANN et al., 2011), águia (*Spilornis cheela*) (CHEN et al., 2011) e beija flor (*Calypte anna*) (GODOY et al., 2013).

Além de boubá aviária, outras nomenclaturas são encontradas na literatura como varíola aviária, pox de pássaros, infecção por poxvírus, varíola das aves, difteria aviária, epiteloma contagioso, molusco contagioso, *gefluegelpocken* (alemão), *viruela aviar* (espanhol), *varirole aviaire* (francês) e *variola gallinarum* (VAN RIPER; FORRESTER, 2007; TRIPATHY; REED, 2008). No Brasil, assume variações regionais de nomenclatura podendo ser chamada de "caroço", "pipoca" e "bexiga". É uma doença conhecida por produtores brasileiros, também presente em aves de subsistência (SILVA et al., 2009).

De ocorrência sazonal e pouco relatada oficialmente no Brasil, são escassas as informações sobre esta doença em animais de produção. Pereira et al. (2014) relatou o mais recente caso de boubá aviária em ave silvestre.

No Brasil, a boubá aviária pode ser considerada doença reemergente e intervém na produção de ovos e de carne (TRIPATHY; REED, 2008; MANAROLLA et al., 2010).

1.2 Poxvírus

O grupo dos poxvírus é formado por um complexo de patógenos virais, classificados como vírus complexos e caracterizados por possuírem uma fita dupla linear de DNA, replicação citoplasmática, sendo os maiores entre todos os vírus que infectam animais (MOSS, 2001). A família Poxviridae é dividida em duas subfamílias, a *Chordopoxvirinae* que agrupam os que infectam vertebrados e a *Entomopoxvirinae*, cujas espécies infectam invertebrados. A sub família *Chordopoxvirinae* é dividida em nove gêneros, os quais incluem os *Orthopoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Avipoxvirus* (ICTV, 2013).

1.3 Avipoxvírus

O vírus da boubá aviária, pertencente ao gênero *Avipoxvirus* está entre os maiores conhecidos (TRIPATHY; REED, 1998; TRIPATHY; REED, 2008). Como membros de outros gêneros da família *Poxviridae*, têm morfologia semelhante em forma de tijolo e medidas de cerca de 330 x 280 x 200 nm. Porém, *Avipoxvirus* apresentam divergências com a conservação das regiões genômicas centrais de outros gêneros da subfamília *Chordopoxvirinae* e avalia-se que os *Avipoxvirus* possam constituir uma nova subfamília dos Poxvírus (TULMAN et al., 2004).

1.3.1 Sensibilidade e resistência

São facilmente destruídos pela maioria dos desinfetantes comuns. Resistente ao éter e clorofórmio pode suportar 1% de fenol, 1:1000 de formalina durante nove dias, hidróxido de potássio a 1% ou aquecimento a 50° C durante 30 minutos (ANDREWS et al., 1978; TANTWAI et al., 1979). Quando dessecado, o vírus da boubá aviária mostra resistência podendo sobreviver em crostas secas por meses ou mesmo anos no ambiente (TRIPATHY; REED, 2008).

A susceptibilidade à infecção pelo vírus da boubá aviária, também importante para adquirir a doença, tem fatores que podem favorecer seu desenvolvimento como as espécies de hospedeiros, idade (aves jovens são mais suscetíveis), estação do ano e ambiente (RITCHIE, 1995).

1.3.2 Classificação das estirpes

Van Riper e Forrester (2007) relataram a identificação de polipeptídios, as diferenças genômicas, os genes não essenciais e imunomoduladores como formas de classificar e diferenciar estirpes. Tentativa para diferenciar estirpes foram descritas por Jarmin et al., (2006) que realizaram estudo filogenético e categorizaram três sub classes de vírus da boubá aviária, divididas em A (estirpe galinhas), B (estirpe pombos) e C (estirpe canários).

Slocombe et al. (2013) detectaram uma nova classe de vírus da boubá aviária não agrupada em nenhum dos grupos existentes. Esse estudo confirmou que são necessários outros genes para obtenção da classificação filogenética definitiva do poxvírus aviário.

1.3.3 Transmissão

A transmissão é relativamente lenta, podendo ser de propagação direta pelo contato entre os animais ou indireta pelo contato dos animais com fômites contaminados (PLEDGER, 2005). A manipulação individual de aves no momento da vacinação pode transportar o vírus das mãos e roupas dos vacinados para os olhos de aves suscetíveis (TRIPATHY; REED, 2008). Já foi relatada a transmissão mecânica do vírus de perus machos infectados para fêmeas pela inseminação artificial (METZ et al., 1975).

Mosquitos também são transmissores do vírus da boubá aviária, 11 espécies de dípteros já foram relatadas como vetores (AKEY et al., 1981). O ácaro *Dermanyss gallinae* tem sido influente na difusão do vírus (SHIRINOV et al., 1972). Zylberberg et al. (2013) afirmam que dois mosquitos são vetores potenciais do vírus da boubá aviária, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*. O *Aedes aegypti*, conhecido como mosquito transmissor da dengue e da febre Chikungunya em humanos está atualmente distribuído em todo Brasil. O mosquito *Culex quinquefasciatus*, conhecido como muriçoca no nordeste brasileiro, é encontrado em vários países da América do Sul. Vargas et al. (2011) sugerem que a localização das lesões em regiões sem penas pode estar associado aos locais preferenciais de picadas de artrópodes transmissores do vírus.

1.3.4 Patogênese

No epitélio do hospedeiro, a biossíntese de um novo vírus envolve duas fases distintas, sendo a primeira resposta durante as primeiras 72 horas, seguida de síntese de um novo vírus em 72-96 horas (CHEEVERS et al., 1968). A síntese de DNA no hospedeiro é acompanhada por hiperplasia epitelial de 36 a 48 horas após infecção. Arhelger e Randall (1964) e Tajima e Ushijima (1966) demonstraram que a replicação do DNA viral no hospedeiro começa entre 12 a 24 horas, seguindo taxa exponencial de síntese entre 60 - 72 horas.

Durante a morfogênese, formas de desenvolvimento do vírus da boubá aviária em fases de transição conduzem a formas maduras do vírus. A próxima fase consiste em tempo latente, com áreas de viroplasma dentro do citoplasma rodeado por membranas incompletas. As partículas se condensam e adquirem membrana externa adicional para se tornar vírions incompletos (ARHELEGER; RANDALL 1964; KREUDER et al., 1999; HERNANDEZ et al., 2001). Este processo produz o corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (corpúsculo de Bollinger), que é observável através da microscopia de luz (VAN RIPER; FORRESTER, 2007).

1.3.5 Aspectos clínicos

O período de incubação varia com a espécie, tipo de vírus e hospedeiros. Tripathy e Reed (2003) sugeriram um período de quatro a 10 dias em galinhas, perus e pombos, e Kirmse (1969) encontrou em aves selvagens períodos de incubação de até um mês. O curso da doença é de duas a três semanas, geralmente a mortalidade é baixa, a menos que ocorra infecção secundária (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009). A doença pode ocorrer nas formas cutânea, diftérica ou mista.

1.3.5.1 Forma cutânea ou seca

Caracteriza-se pela manifestação de lesões cutâneas nodulares nas regiões desprovidas de penas do corpo das aves, principalmente nas regiões da crista, barbelas, pálpebras, canto do bico, parte interna das asas e ao redor da cloaca. No início, estes nódulos são planos e pequenos, e rapidamente aumentam em tamanho, podendo coalescer e tornar-se marrom-escuros (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009). Quando totalmente desenvolvidos, aparecem pústulas circulares, de 3 a 5 mm de diâmetro, com áreas centrais de necrose delimitada por zonas de eritema (VAN RIPER; FORRESTER, 2007).

1.3.5.2 Forma diftérica ou mucosa

Cunningham (1972) descreveu as lesões presentes nas membranas mucosas de frangos de corte como brancas, opacas, com nódulos ligeiramente elevados que aumentavam rapidamente de tamanho, muitas vezes coalescendo de modo a formar um material caseoso, necrótico com o surgimento de pseudomembrana. Essa condição pode ser agravada devido à contaminação bacteriana que pode se estender causando dificuldade respiratória.

1.3.5.3 Forma mista

Ambas as formas podem ser apresentadas, simultaneamente, sendo que a forma cutânea geralmente é de curso relativamente benigno e baixa mortalidade. Entretanto, a forma mista causa quadros clínicos mais graves, como redução da produtividade e fertilidade das aves, caquexia e alta mortalidade (VAN RIPER; FORRESTER, 2007; TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

1.3.6 Alterações patológicas

1.3.6.1 Lesões macroscópicas

A lesão característica da forma cutânea da bouba aviária em galinhas e perus é a formação de nódulos que aparecem primeiro como pequenos focos brancacentos, e então rapidamente aumentam em tamanho e tornam-se amarelos. Algumas lesões primárias aparecem no quarto dia. Pápulas são formadas no quinto ou sexto dia, seguido pela fase vesicular. As lesões podem coalescer e tornarem-se ásperas e acinzentadas ou marrom-escuras (MINBAY; KREIER, 1973).

Na forma diftérica, nódulos opacos brancacentos se desenvolvem sobre as membranas mucosas da boca, língua, esôfago e traquéia. Nódulos aumentam rapidamente em tamanho e coalescem tornando-se amarelos, necróticos, pseudodiftéricos ou membranas diftéricas. Se as membranas são removidas, as erosões sangram. O processo inflamatório pode se estender para dentro dos seios nasais, faringe e laringe (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

1.3.6.2 Lesões microscópicas

A característica mais importante da infecção, nas três formas, é hiperplasia do epitélio e aumento de células, associadas com alterações inflamatórias. Alterações histopatológicas da mucosa traqueal incluem hipertrofia e hiperplasia das células produtoras de muco, com aumento de células epiteliais, as quais contêm corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (TRIPATHY; REED, 2008).

Estes corpúsculos de inclusão podem estar presentes em vários estágios de desenvolvimento, dependendo do tempo após a infecção ocupando quase todo citoplasma, resultante de degeneração celular. Podem ser observados aglomerados de células epiteliais que se assemelha a um papiloma (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

1.3.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico é realizado pela avaliação do histórico, sinais e lesões. O diagnóstico laboratorial se dá por técnicas, descritas a seguir:

1.3.7.1 Histopatologia

É realizada avaliação microscópica de um fragmento do tecido com suspeita de boubá aviária. Esse tipo de exame visa à detecção de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos nas células epiteliais como fator patognomônico para diagnóstico de boubá aviária. A associação das lesões indicativas da doença como hiperplasia do tecido e vacuolização das células também colabora para o diagnóstico definitivo (TRIPATHY; REED, 2008). Esse é o exame padrão ouro, segundo a OIE (2008).

1.3.7.2 Isolamento do vírus

Poxvírus aviário pode ser isolado por meio da inoculação de material suspeito em ovos embrionados de galinha. Aproximadamente 0,1 mL de suspensão de tecido de lesões cutâneas ou diftéricas, com a concentração apropriada de antibióticos, são inoculadas a membrana corioalantóide (MCA) de ovos embrionados com 9-12 dias de idade. Estes são incubados a 37°C durante 5-7 dias, e depois examinados para detecção de lesões tipo “*pox*” (lesões brancas, focais com espessamento generalizado da MCA) (OIE, 2008).

1.3.7.3 Neutralização de vírus

Após a interação vírus / soro, a atividade de vírus residual pode ser testada em ovos embrionados de galinha ou em culturas de células. Este teste pode não ser conveniente para o diagnóstico de rotina, pois apenas algumas estirpes selecionadas têm capacidade de formação de lesões tipo *pox* em membrana cório alantóide de ovos de galinha embrionados (OIE, 2008).

1.3.7.4 Imunodifusão em gel de Agar

Anticorpos podem ser detectados por testes contra os antígenos virais. O antígeno pode ser derivado por sonicação (quebra das células por ondas sonoras de alta frequência) e homogeneização de lesões cutâneas ou MCA infectadas, bem como, por tratamento de culturas de células infectadas (OIE, 2008).

1.3.7.5 Hemaglutinação passiva

Células vermelhas do sangue de ovinos ou equinos são sensibilizadas com um antígeno do vírus da bouba aviária, parcialmente purificado e o antígeno é preparado a partir de MCA infectadas. É um teste sensível, mas não permite a diferenciação do vírus (OIE, 2008, TRIPATHY; REED, 2008).

1.3.7.6 Imunoflorescência, imunoperoxidase e ELISA

Testes de imunoflorescência irão revelar coloração intracitoplasmática específica em células infectadas pelo vírus da bouba aviária. Para a realização da técnica são utilizados anticorpos disponíveis comercialmente (OIE, 2008).

ELISA é o método de escolha para detecção de resposta humoral ao vírus da bouba aviária, sendo capaz de detectar anticorpos de 7-10 dias após a infecção (OIE, 2008). Li et al. (2012) realizou o estudo para desenvolverem novo teste de ELISA utilizando anticorpo policlonal, os resultados mostraram que este foi capaz de detectar o vírus da bouba aviária, e ainda foi capaz de distingui-lo de patógenos como o vírus da laringotraqueíte e vírus da gripe aviária.

1.3.7.7 Análises Moleculares

Como métodos de análise molecular, são utilizados a *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e a *Polymerase Chain Reaction* (PCR). A RFLP permite a discriminação de alguns isolados, porém é uma técnica que demanda tempo e os resultados são relativamente rudimentares (WELI et al., 2004).

PCR é uma técnica que amplifica sequências de DNA utilizando *primers* específicos. Como complemento, realiza-se a análise de sequência dos fragmentos de DNA amplificados para detecção, diferenciação e caracterização molecular de isolados de vírus da bouba aviária (LUSCHOW et al., 2004). A utilidade dessa técnica se dá pela necessidade de pequena quantidade de amostra e segurança no resultado. O uso de *primer* ou iniciador específico descarta possíveis erros no diagnóstico (TRIPATHY; REED, 2008).

1.3.8 Diagnóstico diferencial

Lesões macroscópicas traqueais produzidas pelo vírus da bouba aviária na forma diftérica são semelhantes às causadas pelo vírus da laringotraqueíte infecciosa. No caso da laringotraqueíte,

histologicamente corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos não são detectados no epitélio traqueal (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009). Lesões por deficiência de vitamina A e deficiência de ácido pantotênico ou de biotina em aves jovens (AUSTIC; SCOTT, 1997;) e pela toxina T-2 podem ser confundidas com lesões da boubá aviária (CHI; MIROCHA, 1978).

Em pombos, as lesões diftéricas de boubá aviária podem ser confundidas com lesões causadas por *Trichomonas gallinae*, que são diagnosticadas pelo exame microscópico de esfregaços ou por cultura (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

1.3.9 Controle

1.3.9.1 Biossegurança

Como não há tratamento eficaz, a profilaxia é a melhor solução. Boas práticas de manejo e medidas de biossegurança, particularmente limpeza e desinfecção dos galpões, controle de insetos e pássaros, são essenciais no controle da doença (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

1.3.9.2 Vacinação

As vacinas de boubá aviária são vivas, liofilizadas e produzidas com as cepas pombo ou galinha, com as variações cepa forte ou suave. São usadas na prevenção em reprodutoras, poedeiras, frangos de corte e perus, em áreas onde a doença é endêmica, com histórico de surtos de boubá (FATUNMBI; REED, 1996; TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

Pode ser administrada via “*in ovo*” entre o 18º e 19º dias de vida embrionária. A vacina deve ser reconstituída no diluente de Marek, pois as vacinas são aplicadas simultaneamente (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

Em reprodutoras e poedeiras, geralmente utilizam-se duas vacinações. A vacinação com amostra atenuada suave, ou com a amostra de vírus pombo, é usada em aves com menos de seis semanas de idade, e geralmente, são aplicadas no primeiro dia de vida, no incubatório, por via subcutânea, juntamente com a vacina para Marek. A revacinação, em aves com mais de seis semanas de idade, pode ser feita com amostras atenuadas forte, aplicada via membrana da asa, entre seis e quatro semanas antes do início da produção de ovos (TRIPATHY; REED, 2008).

Frangos de corte alojados em áreas com alto desafio de boubá aviária, ou em áreas infestadas com insetos hematófagos, devem ser vacinados no incubatório, por via subcutânea,

juntamente com a vacina de Marek. Uma só vacinação é suficiente para a proteção de frangos de corte (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

As reações tissulares locais (reação pós-vacinal) consistem na formação de pequenos nódulos induzidos no local de inoculação da vacina na membrana da asa (“pega da vacina”) e apresentam-se aos 5-7 dias após a vacinação. A observação da “pega da vacina” é um bom indicador do êxito da vacinação (TRIPATHY; REED, 2008; BERNARDINO, 2009).

1.3.10 Imunidade

As aves que se recuperam de infecções por varíola aviária, ou que tenham sido vacinadas, geralmente são imunes a nova infecção com essa estirpe do vírus (VAN RIPER; FORRESTER, 2007). Cunningham (1972) descreveu que vacinas com a cepa pombo podem induzir imunidade em galinhas e perus sem desenvolver a doença.

2. Serviço de Inspeção Federal – critérios de inspeção sanitária

2.1 RIISPOA

O Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal - RIISPOA foi aprovado pelo Decreto Nº 30.691, de 29.03.1952, que regulamentou a Lei Nº 1.283, de 18.12.1950, alterado pelo Decreto Nº 1.255, de 25.06.1962, alterado pelo Decreto Nº 1.236, de 02.09.1994, alterado pelo Decreto Nº 1.812, de 08.02.1996, alterado pelo Decreto Nº 2.244, de 04.06.1997, regulamentado pela Lei Nº 7.889, de 23.11.1989.

Conforme Portaria nº 210, (BRASIL, 1998) a inspeção *post mortem* de aves se realiza em três etapas ou "Linhas de Inspeção", a saber:

- Linha A - Exame interno: Realiza-se através da visualização da cavidade torácica e abdominal (pulmões, sacos aéreos, rins, órgãos reprodutores), respeitando-se o tempo mínimo de dois segundos por ave.
- Linha B - Exame de vísceras: Visa o exame do coração, fígado, moela, baço, intestinos, ovários e ovidutos nas poedeiras. Realiza-se através da visualização, palpação, conforme o caso, verificação de odores e ainda incisão. Assim, no exame dos órgãos verifica-se o aspecto (cor, forma, tamanho), a consistência, e em certas ocasiões, o odor. Na execução do exame em questão, deve ser respeitado o tempo mínimo de dois segundos por aves.

- Linha C - Exame externo: Realiza-se através da visualização das superfícies externas (pele, articulações, etc.). Nessa linha, efetua-se a remoção de contusões, membros fraturados, abscessos superficiais e localizados, calosidades, etc. Preconiza-se, também, o tempo mínimo de dois segundos por ave para a realização deste exame.

2.2 SEÇÃO V - Aves e pequenos animais

De acordo com o RIISPOA e com a Portaria nº210 de 10 de novembro de 1998, do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento, qualquer órgão ou outra parte da carcaça que estiver afetada por processo inflamatório deverá ser condenada e, se existir evidência de caráter sistêmico, a carcaça e as vísceras na sua totalidade deverão ser condenadas (BRASIL, 1962; BRASIL, 1998).

Art. 229 - Todas as aves que no exame "*ante*" ou "*post-mortem*" apresentem sinais ou forem suspeitas de tuberculose, difteria, cólera, varíola, tifo aviária, diarreia branca, paratifose, leucoses, peste, septicemia em geral, psitacose e infecções estafilocócicas em geral, devem ser condenadas.

Art. 230 - As enfermidades tais como coccidiose, êntero-hepatite, espiroquetose, coriza infecciosa, epitelioma contagioso, neuro-linfomatose, laringo-traqueíte, aspergilose, determinam rejeição total quando em período agudo ou quando os animais estejam em estado de magreza pronunciada.

2.3 Destino da carcaça

Assim, o regulamento determina que o destino da carne e vísceras comestíveis é determinado na Inspeção *ante-mortem* e *post-mortem*, onde é definido se vai ser aprovado ou condenado total ou parcial (BRASIL, 1998). As carcaças podem ter os seguintes destinos:

- LIBERADA (aprovada para consumo humano): No exame *post-mortem* não foi encontrado nenhuma evidência de afecção anormal ou enfermidade e a operação de abate foi realizado corretamente, não apresentando nenhum problema conseqüente de manejo na recepção, pendura, sangria, depenagem ou na evisceração.
- TOTALMENTE CONDENADAS: É condenado totalmente quando encontrada afecções ou enfermidades que tornam inviável o consumo humano, diminuindo a qualidade da carne e vísceras comestíveis.

- PARCIALMENTE CONDENADAS: Condenam-se alterações resultantes de enfermidades que estão localizadas ou encontram-se nas vísceras comestíveis ou ainda parte da carcaça, sendo então encaminhada para o consumo humano, parte deste com qualidade.

REFERÊNCIAS

- AKEY, B. L.; NAYAR, J. K.; FORRESTER, D. J. Avian pox in Florida wild turkeys: *Culex nigripalpus* and *Wyeomyia vanduzeei* as experimental vectors, **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa v. 17, n. 4, p.597–599, outubro 1981.
- ANDREWS, C.; PEREIRA, H. G.; Virus vertebrates. 4ª edição. Wildy publishing Tindall, Londres, 1978. p.356-389.
- ARHELGER, R.B.; C.C. RANDALL. Electron microscopic observations on the development of fowlpox virus in chorioallantoic membrane. **Virology**, New York, v. 22, n. 1, p. 59-66, janeiro 1964.
- AUSTIC, R. E.; M. L. SCOTT. Nutritional Diseases. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. Diseases of Poultry, 10ª edição. Iowa State University Press: Ames, IA, 1997, p. 47–73.
- BERNARDINO, A. Boubá aviária. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E. N.; DI FÁBIO, J.; SESTIL, L.; ZUANAZE, M. A. F. Doença das Aves, 2ª edição, Campinas, Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009, p. 723 – 731.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal**. Disponível em: < www.agricultura.gov.br/arq.../file/.../RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf > Acesso em: 20/04/2014.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento. **Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998**. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1129> > Acesso em: 20/04/2014
- CHEEVERS, W. P.; RANDALL, C. C. Viral and cellular growth and sequential increase of protein and DNA during fowlpox infection in vivo. **Biology and Medicine**, New York, v. 127, n. 2, p. 401-405, fevereiro 1968.
- CHEEVERS W. P.; O'CALLAGHAN, D. J.; RANDALL, C. C. Biosynthesis of host and viral deoxyribonucleic acid during hyperplastic fowlpox infection in vivo. **Journal of Virology**, Washington, v. 2, n. 5, p. 421-429, maio 1968.
- CHEN, C. C.; PEI, K. J.; LEE, F. R.; TZENG, M. P.; CHANG, T. C. Avian pox infection in a free-living crested serpent eagle (*Spilornis cheela*) in southern Taiwan. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 55, n. 1, p. 143–146, março 2011.
- CHI, M. S.; C. J. MIROCHA. Necrotic oral lesions in chickens fed diacetoxyscirpenol, T-2 toxin, and crotoxin. **Poultry Science**, Champaign, v. 57, n. 3, p. 807–808, maio 1978.

CUNNINGHAM, C.H. Avian Pox. In: HOFSTAD, M. S.; CALNEK, B. W.; HELMBOLDT, C. F.; REID, W. M.; YODER, JR., H. W. Diseases of Poultry, 6ª edição. Iowa State University Press, Ames, Iowa, U.S.A., 1972, p. 707–724.

FALLAVENA, L.C.B.; RODRIGUES, N.C.; SCHEUFLER, W.; MARTINS, N.R.S.; BRAGA, A.C.; SALE, C.T.P.; MORAES, H.L.S. Atypical fowl pox in broiler chickens in southern Brazil. **Veterinary Record**, London, v.132, n.46, p.635, junho 1993.

FATUNMBI, O.O.; REED, W.M. Evaluation of commercial modified live virus fowl pox vaccine for the control of “variant” fowl poxvirus infections. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 40, n. 3, p.582–587, julho/setembro 1996.

GODOY, L. A.; LISA S. DALBECK, L. S.; LISA A. TELL. L. A.; WOODS, L. W.; COLWELL, R. R.; ROBINSON, B.; WETHINGTON, S. M.; MORESCO, A.; WOOLCOCK, P. R.; ERNEST, H. B. Characterization of avian poxvirus in Anna’s hummingbird (*calypte anna*) in California, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 49, n. 4, p. 978–985, outubro 2013.

HERNADEZ, M.; SANCHEZ, C.; GALKA, M. E. ; DOMINGUEZ, L.; GOYACHE, J.; ORIA, J.; PIZARRO, M. Avian pox infection in Spanish Imperial eagles (*Aquila adalberti*). **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 30, n. 1, p. 91–97, mês 2001.

ICTV. Index of viruses. International Committee on Taxonomy of viruses. Disponível em: <www.ictvonline.org>. Acesso em: 15/05/14

JARMIN, S.; MANVELL, R.; GOUGH, R. E.; LAIDLAW, S. M.; SKINNER, M. A. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. **Journal of General Virology**, London, v.87, n. 8, p.2191–2201, agosto 2006.

KREUDER. C.; IRIZARRY-ROVIRA, A. R.; JANOVITZ, E. B.; DEITSCHER, P. J.; DENICOLA, D. B. Avian pox in sanderlings from Florida. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 35, n. 3, p. 582–585, julho 1999.

KIRMSE, P. Host specificity and pathogenicity of pox virus from wild birds. **Bulletin of the Wildlife Disease Association**, v. 5, n. 4, p. 376–386, outubro 1969.

LI, G.; HONG, Q.; REN, Y.; LILLEHOJ, H. S.; HE, C. Development of FPV140 antigen-specific ELISA differentiating fowlpox virus isolates from all other viral pathogens of avian origin. **Poultry Science**, Champaign, v. 91, n. 10, p. 2507–2511, outubro 2012.

LÜSCHOW, D.; HOFFMANN, T.; HAFEZ, H. M. Differentiation of avian poxvirus strains on the basis of nucleotide sequences of 4b gene fragment. **Avian diseases**, Kennett Square, v. 48, n. 3, p. 453-462, setembro 2004.

MANAROLLA, G.; PISONI, G.; SIRONI, G.; RAMPIN, T. Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 6, p. 1– 8, janeiro 2010.

METZ, A. L.; HATCHER, L.; NEWMAN, J. A.; HALVORSON, A. Venereal pox in breeder turkeys in Minnesota. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 29, n. 3, p. 850–853, julho/setembro 1985.

- MINBAY, A.; KREIER, J. P. An experimental study of the pathogenesis of fowlpox infection in chickens. **Avian Diseases**, Kennett Square, v. 17, n. 3, p. 532–539, julho/setembro 1973.
- MOSS, B. Poxviridae: the viruses and their replication D.M. KNIE, P.M. HOWLEY (Eds.), *Fields Virology* (4th ed.), Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia (2001), p. 2849–2883
- OIE. Fowl pox. In: *Office International des Epizooties Terrestrial Manual*. 2008. p. 531 – 537
- PEREIRA, W. L. A.; GABRIEL, A. L. M.; MONGER, S. G. B.; MORAES, L. A.; QUEIROZ, D. K. S.; SOUZA, A. J. S. Cutaneous tumor-like lesions associated with infection by avipoxvirus in a *Dendrocygna autumnalis*. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 15, n. 2, p. 234-238 jun. 2014
- PLEDGER, A. Avian pox virus infection in a mourning dove. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 12, p. 1143-1145, dezembro 2005.
- RITCHIE, B. W. Avian viruses: Function and control. Lake Worth, Florida: Winger's Publ, 1995. p. 285–311.
- SILVA, P. S.; BATINGA, T. D. B.; SALES, T. S.; HERVAL, E. F. G.; RAMOS, I.; MAIA, P. C. C.; FERNANDES, L. M. B. Fowlpox: identification and adoption of prophylactic measures in backyard chickens in Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v. 11, n. 2, p.115-119, abril/junho 2009.
- SHIRINOV, F. B.; IBRAGIMOVA, A. I.; MISIROV, Z. G. Spread of fowl pox virus by the mite *Dermanyssus gallinae*. **Veterinariya**, Moscow, v. 4, p. 48–49, 1972.
- SLOCOMBE, R. F.; MCCOWAN, C.; WANG, J.; HOLZ, P. Avian pox in *Crimson rosellas* (*Platycercus elegans*) in southern Australia. **Avian Pathology**, Huntingdon, v. 42, n. 2, p. 147-150, abril 2013.
- TAJIMA, M., AND T. USHIJIMA. Electron microscopy of avian pox viruses with special reference to the significance of inclusion bodies in viral replication. **Japanese Journal of Veterinary Science**, Tokyo, v. 28, n. 3, p.107–118, junho 1966.
- TANTAWAI, H. H.; AL FALLUJI, M. M.; SHONY, M. O. Heat-selected mutants of pigeon poxvirus. **Acta Virologica**, Bratislava, v. 23, n. 3, p. 249–252, maio 1979.
- TRIPATHY, D. N.; REED, W. N. Pox. In: *Diseases of Poultry*, 10. ed, Ames: Iowa State University Press. 1997. p. 643-659.
- TRIPATHY, D. N.; REED, W. M. Pox. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; JACKWOOD, M. W.; PEARSON, J. E.; REED, W. M. *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*, 4ª edição. American Association of Avian Pathologists, University of Pennsylvania, New Bolton Center, Kennett Square, 1998. p. 137–140.
- TRIPATHY, D. N.; REED, W. M. Pox. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R. *Diseases of Poultry*. 11ª edição. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 2003. p. 253–269.

TRIPATHY, D. N.; REED, W. N. Pox. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. Diseases of Poultry, 12^a edição. Ames: Blackwell Publishing. 2008, p. 291-308.

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

VAN RIPER, C.; FORRESTER, D. J. Avian pox, In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON C. T. Infectious Diseases of Wild Birds. 2^a edição. Ames, Iowa, Blackwell Publishing Professional 2007, p. 131-171.

VARGAS, G. D.; ALBANO, A. P.; FISCHER, G.; HÜBNER, S.; SALLIS, S. E.; NUNES, C. F.; RAFFI, M. B.; SOARES, M. P. Avian pox virus infection in a common barn owl (*Tyto alba*) in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 31, n. 7, p. 620-622, julho 2011.

WELI, S. C.; TRAAVIK, T.; TRYLAND, M.; COUCHERON, D. H.; NILSSEN, O. Analysis and comparison of the 4b core protein gene of avipoxviruses from wild birds: Evidence for interspecies spatial phylogenetic variation **Archives of Virology**, New York, v. 149, n. 10, p. 2035-2046, 2004.

ZIMMERMANN, D.; ANDERSON, M. D.; LANE, E.; VAN WILPE, E.; CAIULEI, O.; DOUGLASS, N.; WILLIAMSON, A. L.; KOTZE, A. Avian poxvirus epizootic in a breeding population of lesser flamingos (*Phoenicopterus minor*) at Kamfers Dam, Kimberley, South Africa. **Journal of Wildlife Diseases**, Ames, Iowa, v. 47, n. 4, p. 989–993, outubro 2011.

ZYLBERBERG, M.; LEE, K. A.; KLASING, K. C.; WIKELSKI, M. Variation with Land Use of Immune Function and Prevalence of Avian Pox in Galapagos Finches, **Conservation Biology**, Boston, v. 27, n 1, p. 103–112, fevereiro 2013.

CAPÍTULO 2 - Primeiro surto de bouba aviária em perus de corte previamente vacinados no Brasil

Ferreira BC ^{1*}, Couto RM ², Ecco R ², Coelho HE ³, Rossi DA ¹, Beletti ME ¹, Silva PL ¹.

¹ Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Medicina Veterinária - UFU

² Universidade Federal de Minas Gerais - Setor de patologia – Escola de Veterinária - UFMG

³ Universidade de Uberaba – Setor de patologia - UNIUBE

RESUMO

Esse estudo realizou a primeira descrição de um surto de bouba aviária ocorrido em perus de corte previamente vacinados no Brasil. As aves apresentaram lesões cutâneas crostosas macroscópicas sugestivas de bouba aviária na região da cabeça e cervical e nenhum sinal adicional foi observado incluindo a não alteração nos índices de mortalidade no lote. No frigorífico, 30 carcaças foram retiradas da linha de abate para coleta de dois fragmentos de pele com lesões para caracterização histológica e pesquisa do vírus. As amostras foram fixadas em formol tamponado 10%, embebidas em parafina, cortadas em secções de 5 µm e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para visualização em microscópio de luz clara. A identificação do agente foi realizada pela técnica de PCR convencional com posterior sequenciamento. No exame histopatológico foram observados: acantose, hiperqueratose e degeneração hidrópica. A presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (Bollinger) nos queratinócitos foi observada em 46,6% das amostras. A reação pela PCR foi positiva para 83,3% das amostras. Com o uso das duas técnicas de diagnóstico foi possível determinar que 93,3% das amostras foram positivas para bouba aviária. No estudo filogenético realizado, as amostras apresentam 100% de identidade entre si sugerindo que o surto ocorreu por uma única estirpe de vírus. O fragmento do gene sequenciado não permitiu a

Autor para correspondência: ¹ Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 43, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, 38402 018 Brasil. pauloufu@hotmail.com

diferenciação das estirpes virais de perus, vacinal ou de galinhas. Estudos incluindo o sequenciamento de outros genes são necessários para melhor caracterização do vírus responsável por surtos da doença em perus das granjas de Minas Gerais, Brasil.

Palavras chave: *Avipoxvirus*, fowlpox, *Meleagris gallopavo*, vacina.

ABSTRACT

This study made the first description of a outbreak of fowlpox in vaccinated turkeys previously in Brazil. The birds had skin crusted with macroscopic lesions, suggestive of fowlpox in the head and neck and no additional signal was observed including no change in mortality rates in the flock. In the slaughterhouse, 30 carcasses were removed from the slaughter line to collect two skin fragments with lesions for histological characterization and research of the virus. The samples were fixed in 10% buffered formalin, embedded in paraffin, cut into sections of 5 μm and stained with hematoxylin-eosin for viewing in microscope. The agent identification was performed by conventional PCR with subsequent sequencing. On histopathology were observed acanthosis, hyperkeratosis and hydropic degeneration. The presence of eosinophilic intracytoplasmic inclusion corpuscles (Bollinger) on keratinocytes was observed in 46.6% of the samples. The reaction by PCR was positive for 83.3% of the samples. With the use of the two diagnostic techniques was determined that 93.3% of the samples were positive for fowlpox. In the phylogenetic study, the samples show 100% of identity to each other suggesting that the outbreak occurred by a single virus strain. The sequenced gene fragment did not allow the differentiation of viral strains of turkeys, vaccinal strain or chickens. Studies including the sequencing of other genes are required for further characterization of the virus responsible for outbreaks in turkeys of farms of Minas, Brazil.

Key words: *Avipoxvirus*, fowlpox, *Meleagris gallopavo*, vaccine.

INTRODUÇÃO

Bouba aviária, provocada por um vírus pertencente à família Poxviridae, gênero *Avipoxvirus* é uma doença que afeta exclusivamente aves (Tripathy & Reed, 2003). Também conhecida como varíola aviária ou epiteloma contagioso, é uma enfermidade específica que afeta tanto aves domésticas como silvestres podendo ser transmitida por vetores artrópodes ou pelo contato com partículas infecciosas (Tripathy & Reed, 2008).

Seu curso é caracterizado por duas fases: uma resposta inicial do hospedeiro com hiperplasia celular acentuada durante as primeiras 72 horas e síntese de vírus entre 72-96 horas após a infecção (Cheevers & Randall, 1968; Cheevers *et al.*, 1968). Bouba aviária acarreta na formação de lesões nodulares proliferativas da pele, nas regiões desprovidas de pena no corpo da ave (forma cutânea) e/ou em lesões fibrino-necróticas e proliferativas na membrana mucosa do trato respiratório superior, boca e esôfago (forma diftérica) (Moço *et al.*, 2008). Também é possível a manifestação das duas formas, caracterizando a forma mista.

Apesar de não ser uma doença de alta letalidade e de ocorrência atípica, relatos de bouba aviária em animais silvestres são cada vez mais frequentes no Brasil (Catroxo *et al.*, 2009; Vargas *et al.*, 2011; Pereira *et al.* 2014). No país, bouba aviária é observada em matrizes de galinhas e perus, mas devido a sua ocorrência sazonal e as manifestações brandas não existem pesquisas recentes.

Relatos de bouba são comuns em vários países e estudos filogenéticos foram descritos por Luschow *et al.* (2004), Jarmin *et al.* (2006) Manarolla, *et al.* (2010) e Gyuranecz *et al.* (2013) com isolados dos Estados Unidos, Itália, Alemanha e em outros países. Pesquisas moleculares, correlacionadas às manifestações clínicas permitem a identificação e comparação genética entre estirpes pela consulta a um banco de estirpes identificadas por espécie infectada, país de origem, ano de isolamento, tipo isolado (forma cutânea, diftérica ou mista) e forma de isolamento (lesões ou cultivo em ovos embrionados).

Vacinas vivas têm sido utilizadas para evitar a doença sendo realizada a imunização das aves suscetíveis com estirpes vivas atenuadas. Estas estirpes são provenientes de bouba aviária de

galinhas, ou de pombos (Tripathy & Reed, 1997). Entretanto, a eficácia dessas vacinas vem sendo questionada em todo o mundo, visto que nos últimos anos, surtos da doença têm sido relatados em perus previamente vacinados (Odoya *et al.*, 2006; Estrella-Tec *et al.*, 2013).

Estudo experimental com perus vacinados e não vacinados para boubá aviária revelaram que a vacinação não influenciou a incidência da doença, mas reduziu a gravidade da manifestação clínica e a mortalidade em aves jovens nas populações estudadas (Estrella-Tec *et al.*, 2013).

A queda na produtividade dos animais e a elevação dos índices de condenação em abatedouros por boubá aviária vêm ocorrendo nos plantéis brasileiros. Com o intuito de colaborar com o avanço das pesquisas, esse estudo realizou a primeira descrição de um surto de boubá aviária ocorrido em perus de corte previamente vacinados, no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

Desde o início dos primeiros sinais de boubá aviária na região, a quantidade de aves afetadas no período foi registrada, em conjunto com o Serviço de Inspeção Federal regional, por meio de mapas nosológicos oficiais. Esse monitoramento se estendeu até o ano de 2014.

Coleta das amostras

Perus provenientes de um lote de 840 perus pertencentes a uma granja do município de Indianópolis foram abatidos com peso médio aproximado de 15.440kg aos 115 dias de idade em junho de 2013. Os animais eram vacinados para boubá aviária. Desse lote, 30 carcaças foram retiradas da linha de abate para coleta de fragmentos de pele com lesões e em seguida eram encaminhadas a graxaria.

A coleta de uma lesão de cada ave foi realizada pinçando e retirando um fragmento de pele utilizando bisturi e pinça estéril. Estes fragmentos foram seccionados de forma a conter áreas da pele com lesão e margem de pele normal. As secções foram divididas e armazenadas paralelamente

em formalina tamponado 10% para a avaliação histológica e em microtubos, que foram armazenados sob congelamento à - 20°C até o momento da análise molecular.

Análise histopatológica

As análises histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Histologia da Universidade Federal de Uberlândia. Os fragmentos fixados em formalina tamponada a 10% por 48h foram transferidas para recipientes contendo álcool 70%. Os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol, incluídos em parafina para a obtenção de cortes seriados à espessura de 6 micrômetros (μm), corados pela hematoxilina e eosina e avaliados à microscopia de luz clara. O diagnóstico histopatológico da bouba aviária foi baseado na observação de lesões típicas associadas a corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (Tripathy & Reed, 2008).

Análise molecular

A técnica molecular foi realizada no laboratório de Patologia Molecular do Setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Para extração de DNA, as amostras foram descongeladas e para a extração do DNA foi utilizado o iodeto de sódio (NaI) e a sílica, com procedimentos de acordo com Boom *et al.* (1990) e Volglstein & Gilles (1979), com modificações.

As amostras de tecido foram raspadas com o uso de uma lâmina de bisturi 2.0 em placa de Petri de vidro, e em seguida adicionadas em um microtubo de 1,5 mL e maceradas com um pistilo. Após, foi adicionado ao conteúdo, 300 μL de NaI (que promoveu a dissolução do tecido e o rompimento da membrana celular). Para a adsorção do DNA em solução foi utilizado 40 μL de sílica. Prosseguia-se com três lavagens com 500 μL de etanol (*etanol-wash*), e por fim lavagem com 1mL de acetona.

O DNA extraído foi eluído em 40 µL de TE (tris EDTA) e em seguida, analisado e quantificado pela medida de absorção atômica a 260 nm em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, Thermo Scientific, Wilmington, U.S.A.).

O DNA extraído foi submetido ao teste de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando-se *primers* específicos: 5'-CAGCAGGTGCTAAACAACAA 3' e 5'-CGGTAGCTTAACGCCGAATA 3' (Lawson *et al.*, 2012). As reações de PCR foram realizadas de acordo com a recomendação do fabricante. Para 25 µL de volume (PCR Master mix Promega), utilizou-se 200 ng de DNA da amostra e 0,02 nmol de primer. A amplificação foi realizada em termociclador nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 7 minutos (Lawson *et al.*, 2012). Os produtos de PCR amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizadas após coloração com brometo de etídio em transiluminação ultravioleta.

Quatro amostras positivas para o vírus da bouba aviária foram encaminhadas para sequenciamento do gene *fpv167* no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia/Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG.

A amplificação do fragmento do gene *fpv167* (p4b locus) baseou-se na metodologia descrita por Lawson *et al.* (2012). Assim, 2 µL do *amplicon* de cada amostra foram pipetados em microtubos juntamente com 0,5 µL (0,005 nmol) de cada *primer* (*foward* e *reverse* separadamente) e 5µL de água ultrapura, totalizando 7,5 µL em cada tubo. As sequências estão descritas na Tabela 1.

Tabela. 1 Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para sequenciamento de amostras de bouba aviária.

Gene amplificado	Primer	Sequência do primer (5'→3')	Tamanho produto de PCR	Referência
<i>fpv167</i>	P1 fpv	CAGCAGGTGCTAAACAACAA	578 pb	Lawson <i>et al.</i> , (2012).
	P2 fpv	CGGTAGCTTAACGCCGAATA		

A amplificação foi realizada nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos, seguido de 45 ciclos 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72 °C por 7 minutos.

Os produtos amplificados de DNA foram extraídos e purificados da agarose utilizando o kit (Invisorb® Spin DNA *Extraction Kit*), conforme recomendações do fabricante. Cada amostra foi sequenciada três vezes, nas direções *foward* e *reverse*, pelo método Sanger por eletroforese capilar utilizando o kit (ABI Taq DyeDeoxy Terminator versão 3.1 *Cycle Sequencing Kit*) de acordo com as instruções do fabricante (*Applied Biosystems, Inc., Foster City, California, USA*) em um sequenciador automático (ABI 3130 Genetic Analyzer).

As reações de sequenciamento foram realizadas com um passo inicial de desnaturação a 96° C por 1 min; 30 ciclos 96° C por 15 s, 50° C por 15 s e 60° C por 4 min; finalizando em um último passo a 8° C indefinidamente (Programa SeqDNA). A seguir, o produto desta reação foi precipitado com 40 µL de isopropanol a 65%, incubado à temperatura ambiente no escuro por 30 minutos e centrifugado a 14.000 rpm por 45 minutos. O sobrenadante foi removido, acrescentou-se 500 µL de etanol 60% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), centrifugou-se a 14.000 rpm por 10 minutos e o precipitado foi desidratado em estufa a 95°C por 5 minutos.

Com o uso do programa (*software*) SeqScap (versão 2.5), as sequências obtidas foram analisadas, e sequências consenso foram criadas. O programa Mega (versão 5.0) foi utilizado no alinhamento com sequências depositadas no *GenBank* database (NCBI) utilizando a plataforma BLASTn. As árvores filogenéticas foram geradas pelo método *neighbour-joining* com *bootstrap* 1000, Kimura 2 parâmetros.

As sequências publicadas no *Genbank* utilizadas para comparação com a estirpe isolada de perus com boubá aviária abatidos em Minas Gerais estão discriminadas na Tabela 2.

Tabela 2. Sequências do gene *fpv167* do vírus de bouba aviária publicadas no *GenBank* utilizadas para comparação com a estirpe isolada de perus com bouba aviária em Minas Gerais.

Nº Acesso GenBank	Nome
HM623675	<i>Fowlpox</i> completo 4b
AM050387	<i>Turkeypox</i> CVL 2/11/66
AM050388	<i>Turkeypox</i> 10/12/98
GQ180212	<i>Turkeypox</i> PA213/07
AY530304	<i>Turkeypox</i> GB 134/01
KC017961	<i>Turkeypox</i>
JN615018	Avipoxvirus penguin/AP/ARG/2007
KC017966	Avipoxvirus Georgia
KC017967	Avipoxvirus Hungary
KC017998	Avipoxvirus California
KF722863	Fowlpox FWPV3/DOM
KM396387	Fowlpox IPVDF/LSA/2012/01
KM396388	Fowlpox IPVDF/LSA/2012/02
KM396389	Fowlpox IPVDF/LSA/2012/03
KM396390	Fowlpox IPVDF/LSA/2012/04
AM050377	<i>Chickenpox</i> CVL 174/4/04
AM050378	<i>Chickenpox Vaccina Mild</i> Fort Dodge
AM050379	<i>Fowlpox Nobilis Variole</i> MSD
AM050380	<i>Chickenpox Vaccina</i> Diftosec Merial
KC017960	<i>Fowlpox Hungary</i>
AY530302	<i>Fowlpox HP</i>
AM050384	<i>Canarypox Vaccina</i> Fort Dodge
AM050375	<i>Canarypox</i> 1445/97/33
AY530309	<i>Canarypox</i> GB 724/01-22
KC018060	<i>Canarypox</i> Chile
AM050389	<i>Sparrowpox</i> CVL 9037 66
AM050390	<i>Sparrowpox</i> CVL 9037 23
AY530303	<i>Pigeonpox</i>
AY530305	<i>Ostrich</i>

RESULTADOS

Os primeiros sinais da doença foram observados em uma granja de perus em dezembro de 2012. Durante a coleta, em junho de 2013, as aves apresentavam lesões características da forma cutânea de bouba. De aparência crostosa e nodular, as lesões eram disseminadas nas regiões da cabeça e cervical. Nenhum sinal clínico adicional foi observado, e não ocorreu aumento na mortalidade no lote.

No exame histopatológico das lesões cutâneas (Figuras 1a, 1b, 1c, 1d), observou-se em todas as amostras hiperqueratose, acantose e degeneração hidrópica. A presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos (Bollinger) nos queratinócitos foi evidenciada em 46,6%

das amostras. Nos casos em que não foram observados corpúsculos de inclusão, nas lesões cutâneas, predominava necrose (ulceração) de toda a camada epitelial, a qual foi substituída por restos necróticos e queratina.

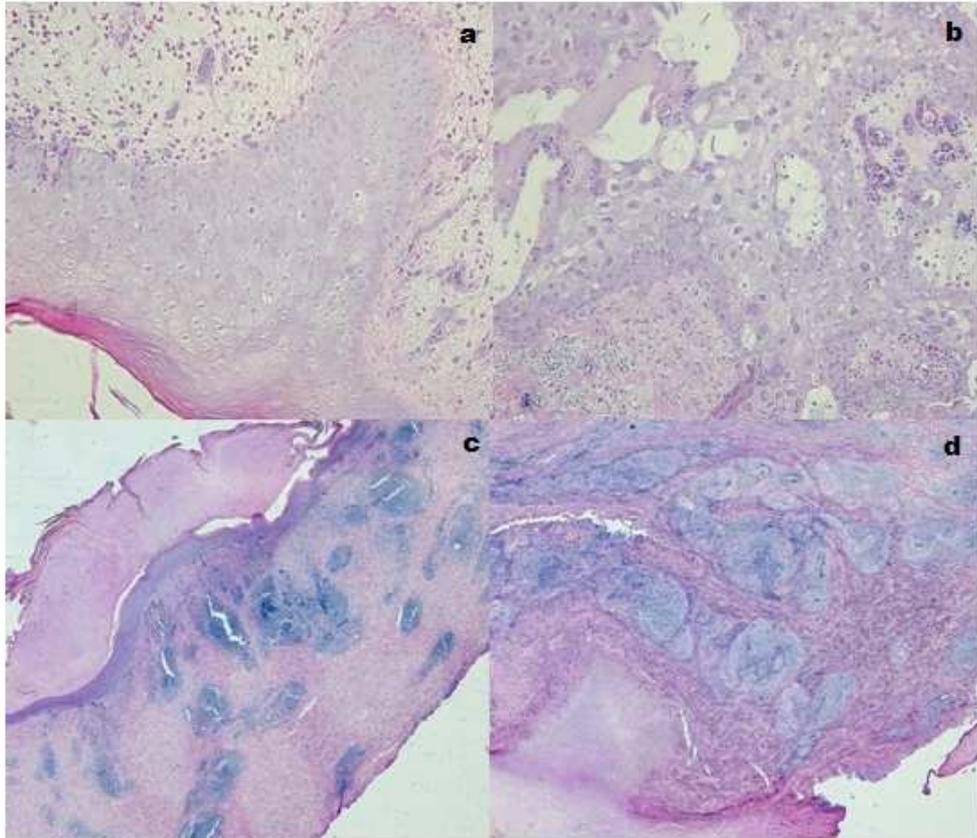


Figura 1a - Hiperplasia do tecido epitelial H&E x20. Figura 1 b - Células com degeneração hidrópica, vacuolização e presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos H&E x20. Figura 1c - Hiperplasia do tecido com grande quantidade de queratina, infiltrado inflamatório margeando o tecido epitelial. H&E 5x. Figura 1 d - Grande quantidade de infiltrado inflamatório H&E 5x

Na derme observou-se infiltrado inflamatório multifocal a coalescente por linfócitos e plasmócitos. A classificação desses infiltrados inflamatórios em três graus, considerando a quantidade de focos presente em cada secção de pele com lesão demonstrou que 56,6% das amostras apresentaram infiltrado inflamatório difuso, 30% infiltrado inflamatório multifocal, 10% infiltrado inflamatório focal e 3,3% não apresentaram infiltrado inflamatório (Tabela 3). Na pele de algumas aves observaram-se também erosões e ulcerações associadas a infiltrado heterofílico e colônias bacterianas.

Tabela 3. Amostras com a presença (P) /ausência (A) do corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico (CI) e classificação dos infiltrados inflamatórios linfocitários e plasmocitários.

Amostra	CI	Classificação	Amostra	CI	Classificação	Amostra	CI	Classificação
P1	P	++	P11	P	++	P21	P	+++
P2	A	+	P12	A	++	P22	P	++
P3	P	+++	P13	A	+++	P23	A	+++
P4	P	+++	P14	A	+++	P24	P	+++
P5	A	+++	P15	A	++	P25	A	+++
P6	P	+++	P16	A	+++	P26	A	+++
P7	P	++	P17	A	+++	P27	P	-
P8	A	+	P18	P	++	P28	P	++
P9	A	+++	P19	A	+	P29	A	+++
P10	P	+++	P20	P	++	P30	A	+++

P - Presença; A - Ausência; + Infiltrado inflamatório focal; ++ Infiltrado inflamatório multifocal; +++ Infiltrado inflamatório difuso

A análise histopatológica associada a PCR permitiu a detecção do antígeno do vírus da boubá aviária em 93,3 % das amostras analisadas neste estudo. A histopatologia permitiu estabelecer diagnóstico definitivo para a doença em 46,6% dos casos. A figura 2 ilustra os produtos amplificados do fragmento do gene 4b do genoma completo do vírus da boubá aviária em gel de garose 1,5%.

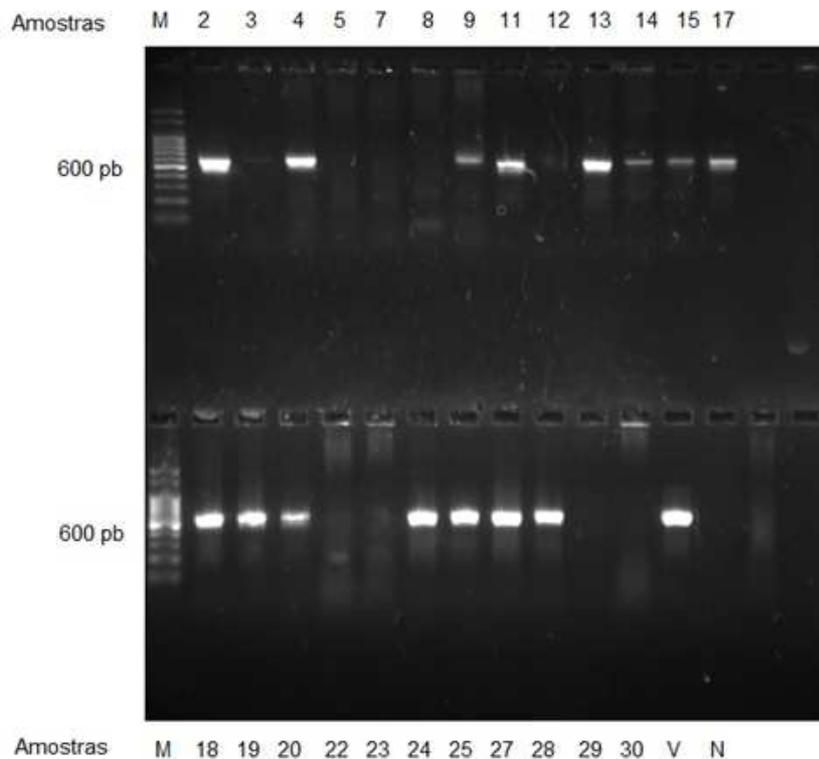


Figura 2. Imagem da eletroforese em gel de agarose 1,5% de PCR para Avipoxvírus onde podem ser visualizados os produtos da amplificação por PCR do fragmento do gene P4b do vírus da boubá aviária com 578pb. As amostras estão descritas numericamente: M: marcador molecular; V: controle positivo; N: controle negativo.

O sequenciamento das amostras P1, P6, P10 e P26 demonstrou que as estirpes eram idênticas ao genoma completo do vírus (*Fowlpox* completo 4b). As sequências *Turkeypox*, *Turkeypox* GB134/01, *Turkeypox* PA213/07, *Fowlpox* IPVDF/LSA/2012/01, *Fowlpox* IPVDF/LSA/2012/02, *Fowlpox* IPVDF/LSA/2012/03, *Fowlpox* IPVDF/LSA/2012/04 (subtipo perus) *Chickenpox* Vaccina Mild Fort Dodge, *Chickenpox* Vaccina Diftosec Merial, *Fowlpox* Nobilis Variole MSD, (vacinas) *Fowlpox* Hungary, *Chickenpox* CVL 174/4/04 e *Fowlpox* HP (subtipo galinhas) também apresentaram 100% de identidade com a sequência obtida (Figura 3).

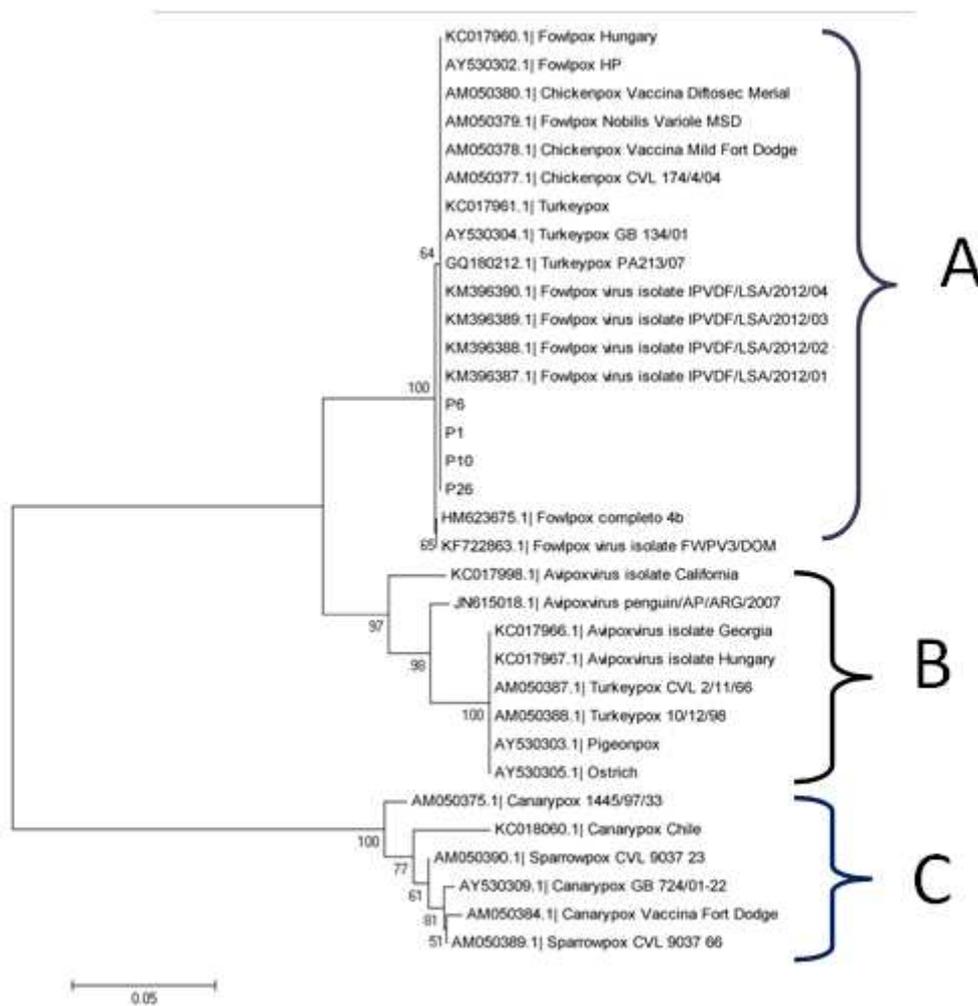


Figura 3. Árvore filogenética gerada a partir da sequência alinhada e agrupada concatenada de nucleotídeos do fragmento P4b do gene *fpv167* e dividida em três subgrupos. Método: *Neighbor-joining* com análise *bootstrap* de 1000 repetições usando o modelo Kimura 2-parâmetros. A – subgrupo da estirpe galinha; B – subgrupo da estirpe pombo C – subtipo da estirpe canário.

Todas as amostras avaliadas nesse estudo apresentaram mutação na região 549 do gene, onde houve a troca de uma adenina (A) por uma guanina (G), conforme observado na Tabela 4.

DISCUSSÃO

As lesões histopatológicas foram consistentes com a forma clínica cutânea de boubá aviária, confirmando a suspeita clínica e as lesões microscópicas. A análise molecular pela PCR e sequenciamento permitiu o diagnóstico da infecção pelo poxvírus aviário. A origem do surto permanece desconhecida.

Resultado do monitoramento realizado na região em conjunto com o Serviço de Inspeção Federal apontou que a doença ocorreu durante dezembro 2012 e dezembro 2013, com destaque para aumento da ocorrência no verão. Este dado sugere a presença e persistência do vírus na região mesmo com os animais vacinados de forma profilática, uma vez que a doença foi detectada. Esta doença apresenta distribuição geográfica cosmopolita, sendo de ocorrência cíclica em áreas endêmicas, principalmente em áreas de alta densidade de produção avícola, como a região do surto (Tripathy & Reed, 2008; Bernardino, 2009).

Alguns fatores podem ser relevantes na identificação da origem desse surto. Arranhões produzidos pelas unhas de outras aves contaminadas no lote, presença de insetos hematófagos na época do surto (verão) e a hipótese de reversão de virulência ou de variação da estirpe vacinal devem ser consideradas (Fallavena *et al.*, 1993; Tripathy & Reed, 2008; Bernardino, 2009).

A presença de mosquitos é fator importante na introdução do vírus na região. Além das 11 espécies citadas por Akey *et al.* (1981), Zylberberg *et al.* (2013) relataram que as espécies *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, facilmente encontradas no Brasil, também são possíveis vetores de transmissão de boubá aviária. Singh *et al.* (2000) teorizaram hipótese sobre surtos de boubá aviária ocorridos em lotes previamente vacinados que o aparecimento de estirpes contendo uma integração de genes do vírus da reticuloendoteliose no seu genoma, aumentaria a virulência dessas estirpes (Ramos *et al.*, 2002).

Normalmente a boubá aviária cutânea é uma doença de cura espontânea e com manifestações mais brandas, como um episódio relatado por Silva *et al.*, (2009) em galinhas

caipiras brasileiras. No presente estudo, provavelmente, há envolvimento de uma cepa viral mais agressiva, que pode ter sido disseminado nos plantéis da região. Diversas fontes podem ter sido a causa da introdução e disseminação do vírus na região no Triângulo Mineiro como insetos hematófagos e/ou medidas de biossegurança insuficientes (Tripathy & Reed, 2008).

O diagnóstico preliminar foi realizado com a observação macroscópica de lesões sugestivas de boubá aviária cutânea nos perus, pelos sinais clínicos e histopatológicas similares aos relatados para a doença. As principais alterações macroscópicas observadas neste episódio foram lesões nodulares crostosas principalmente nas regiões da carúncula, cervical, pálpebras e canto do bico, concordando com as descritas para boubá aviária cutânea, por Van Riper & Forrester (2007); Tripathy & Reed (2008) e Bernardino (2009).

A suspeita confirmou-se pelas alterações microscópicas observadas no exame histopatológico das lesões, sugestivas de boubá aviária: hiperqueratose, acantose e degeneração hidrópica. Os achados estão em concordância com as descrições de Tripathy & Reed (2008) e Bernardino (2009). A presença do corpúsculo de inclusão intracitoplasmático eosinofílico que é patognomônico para boubá aviária confirmou o diagnóstico de boubá aviária em 46,6% das amostras. Este está presente 72 horas pós-infecção no tecido epitelial (Arhelger *et al.*, 1962). As demais 53,4% amostras, devido à ausência do corpúsculo, permanecem com o diagnóstico provisório baseado nas lesões sugestivas de boubá aviária.

O uso de técnicas específicas como a PCR possibilita o diagnóstico definitivo de várias doenças. Nesse estudo 25/30 (83%) das amostras de fragmentos de pele foram confirmadas como positivas para boubá aviária. Dentre as 5/30 (17%) amostras negativas, três amostras apresentaram no exame histopatológico, corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos que é um sinal patognomônico da enfermidade (Tripathy & Reed, 2008).

As duas amostras restantes foram negativas tanto no exame histopatológico quanto na PCR. É provável que a negatividade em ambos os testes laboratoriais seja consequência da amostragem. Para ambos os testes, somente um pequeno fragmento de pele lesionada foi coletada, e as lesões

presentes nestes fragmentos podem ser resultantes de infecções bacterianas secundárias (Tripathy & Reed, 2008; Parker *et al.*, 2011). Estes resultados ressaltam a importância da associação de análises laboratoriais ao diagnóstico clínico para a identificação da boubá aviária.

No presente estudo, considerando o sequenciamento do fragmento do gene *fpv167* as quatro amostras analisadas apresentam 100% de identidade entre si sugerindo que o surto ocorreu por uma única estirpe de vírus. Estudos filogenéticos realizados por Jarmin *et al.* (2006) e Manarolla *et al.* (2010), concluíram que a grande maioria dos isolados de poxvírus aviário são agrupados em três subtipos principais, representados pelas estirpes galinha, canário e psitacídeo.

Quando comparadas por análise filogenética o fragmento do gene *fpv167* desse estudo foi idêntico a 13 estirpes de vírus obtidas de perus, frangos e também estirpes vacinais, incluindo o fragmento do gene 4b do genoma completo do vírus de galinha, identificado pelo subgrupo A (estirpe galinha). Essa identificação em subgrupos permite inferir que as amostras de perus, separadas dos subgrupos B que reúnem estirpes de pombos, perus e avestruz, e C, que reúne estirpes de canários e pardais respectivamente, não são pertencentes à estirpe de canários e de outras aves silvestres.

As amostras estudadas foram posicionadas próximas as estirpes de campo de perus identificadas no Brasil, Fowlpox IPVDF/LSA/2012/01, Fowlpox IPVDF/LSA/2012/02, Fowlpox IPVDF/LSA/2012/03 e Fowlpox IPVDF/LSA/2012/04, todas estas também agrupadas próximas ao fragmento do gene 4b do genoma completo do vírus galinha, indicando 100% de identidade (Figura 3). Não há como estabelecer uma relação com cepas vacinais ou de campo devido ao fragmento do gene sequenciado ser curto e similar às duas estirpes.

Os resultados das análises deste estudo (clínicos, histopatológicos e moleculares) confirmam que o surto foi devido ao vírus da boubá aviária. O alinhamento das sequências obtidas no estudo do gene da boubá aviária em perus demonstrou que a origem do vírus não é de aves selvagens ou passeriformes e que este surto ocorreu por uma única estirpe de vírus. A caracterização filogenética

estabeleceu que o fragmento do gene *fpv167* utilizado não foi capaz de diferenciar as amostras estudadas de estirpes vacinais para galinhas ou cepas de campo de galinhas e perus.

Não pode ser excluído que os vírus encontrados nas amostras a partir de perus não tenham inicialmente origem a partir de vacinas vivas atenuadas ou mesmo do vírus de campo de galinhas e perus. Estudos incluindo o sequenciamento adicional de outros genes são necessários para melhor caracterização do vírus que infectou os perus estudados.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e a CAPES, pelo financiamento da pesquisa e bolsa concedida. Ao Serviço de Inspeção Federal pelo apoio.

REFERÊNCIAS

Arhelger RB, Darlington RW, Gafford LG, Randall CC. An electron microscopic study of fowlpox infection in chick scalps. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1962; 11:814-825.

Back A, Soncini RA, Ruthes O, Madureira Jr S, Flores R. An atypical fowl pox outbreak in broilers in southern Brazil. *Avian diseases* 1995; 4: 902-906.

Bernardino A. Boubá aviária. In: Berchieri Jr. et al. – Campinas, Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas 2009; 1104: 723 – 731.

Binns MM, Boursnell MEG, Tomley FM, Campbell J. Analysis of the fowlpox virus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. *Virology* 1989; 170: 288–291.

Boom R, Sol C, Salimans MM. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 1990; 28: 495-503.

Boyle DB, Pye AD, Coupar BEH. Comparison of field and vaccine strains of Australian fowlpox viruses. *Archives of Virology* 1997; 142: 737–748.

Catroxo MHB, Pongiluppi T, Melo NA, Milanelo L, Petrella S, Martins AMCPF, Rebouças, MM. Identification of Poxvirus under transmission electron microscopy during outbreak period in wild birds, in São Paulo, Brazil. *International Journal of Morphology* 2009; 27: 577-585.

Cheevers WP, O'Callaghan DJ, Randall CC. Biosynthesis of host and viral deoxyribonucleic acid during hyperplastic fowlpox infection in vivo. *Journal of Virology* 1968; 5: 421-429.

Eaves G, Flewett TH. The structure of fowl-pox inclusions (Bollinger bodies). *Journal of Hygiene* 1955; 53: 102-105.

Estrella-Tec JE, Gutiérrez-Ruiz EJ, Ramírez-González S, Aranda-Cirerol F, Santos-Ricalde R, Puerto-Nájera JL. Evaluation of a commercial vaccine against avian poxvirus in turkeys kept in the backyard system in the state of Yucatan, Mexico. *Avian Pathology* 2013; 42: 536-540.

Fallavena LC, Rodrigues NC, Scheufler W, Martins NR, Braga AC, Salle CT, Moraes HL. Atypical fowl pox in broiler chickens in southern Brazil. *Veterinary Record* 1993; 132: 635.

Fatunmbi OO, Reed WM. Evaluation of commercial modified live virus fowl pox vaccine for the control of “variant” fowl poxvirus infections. *Avian Diseases* 1996; 40: 582–587.

Gyuranecz M, Foster JT, Dán A, Ip HS, Egstad KF, Parker PG, Higashiguchi JM, Skinner MA, Höfle U, Kreizinger Z, Dorrestein GM, Solt S, Sós E, Kim YJ, Uhart M, Pereda A, González-Hein G, Hidalgo H, Blanco JM, Erdélyi K. Worldwide phylogenetic relationship of avian poxviruses. *Journal of Virology* 2013; 87: 4938–4951.

Jarmin S, Manvell R, Gough RE, Laidlaw SM, Skinner MA. Avipoxvirus phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. *Journal of General Virology* 2006; 87: 2191–2201.

Lawson B, Lachish S, Colvile KM, Durrant C, Peck KM, Toms M. P, Ben CS, Cunningham AA. Emergence of a novel avian pox disease in British tit species. *PloS One* 2012; 11: e40176.

Lüschow D, Hoffmann T, Hafez HM. Differentiation of avian poxvirus strains on the basis of nucleotide sequences of 4b gene fragment. *Avian Diseases* 2004; 48: 453-462.

Manarolla G, Pisoni, Sironi G, Rampin T. Molecular biological characterization of avian poxvirus strains isolated from different avian species. *Veterinary Microbiology* 2010; 140: 1– 8.

Moço HF, Dias LC, Andolfato LHM, Alves ML, Bronzatto A, Raya DA. Boubá Aviária. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* 2008; 11:1-5.

Odoya EM, Abegunde A, Agyogbo BG, Omotainse SO, Gwankat E, Okparapara UG. Outbreak of turkey pox disease in fowl pox vaccinated poults in Vom Plateau State of Nigeria. *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology* 2006; 7: 136–138.

OIE. 2008. Fowl pox. In: Office International des Epizooties Terrestrial Manual. Pp 531 – 537

Pereira WLA, Gabriel ALM, Monger SGB, Moraes LA, Queiroz DKS, Souza AJS. Cutaneous tumor-like lesions associated with infection by avipoxvirus in a *Dendrocygna autumnalis*. *Ciência Animal Brasileira* 2014; 15: 234-238.

Ramos E, Coroas L, González M, Fernández A. Detección de secuencias pertenecientes al virus de la reticuloendoteliosis en el genoma de cepas vacunales y clones del virus de la viruela aviar. *Revista Salud Animal* 2002; 24: 134–141.

Silva PS, Batinga TDB, Sales TS, Herval EFG, Ramos I, Maia, PCC, Fernandes LMB. (2009). Fowlpox: identification and adoption of prophylactic measures in backyard chickens in Bahia, Brazil. *Brasilian Journal of Poultry Science* 2009; 11: 115-119.

Singh P, Kim TJ, Tripathy DN. Re-emerging fowlpox: evaluation of isolates from vaccinated flocks. *Avian Pathology* 2000; 29: 449–455.

Tripathy DN, Reed WN. Pox. In: *Diseases of Poultry*, 10. ed, Ames: Iowa State University Press. 643-659; 1997.

Tripathy DN, Reed WN. Pox. In: *Diseases of Poultry*, 12. ed, Ames: Blackwell Publishing, 291-308; 2008.

Van Riper C, Forrester DJ. Avian pox In: *Infectious Diseases of Wild Birds*. (eds Thomas N. J., Hunter D. B. & Atkinson C. T.) Blackwell Publishing Professional, 2007; 131-171.

Vargas GD, Albano AP, Fischer G, Hübner S, Sallis SE, Nunes CF, Soares MP. Avian pox virus infection in a common barn owl (*Tyto alba*) in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2011; 31:620-622.

Vogelstein B, Gillespie D. Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1979; 76:615–619.

CAPÍTULO 3 - Elaboração de padrão de condenação para carcaças com boubá aviária

Ferreira BC ^{2*}, Ecco R ², Coelho HE ³, Rossi DA ¹, Beletti ME ¹, Silva PL ¹.

¹ Universidade Federal de Uberlândia – Faculdade de Medicina Veterinária – UFU

² Universidade Federal de Minas Gerais - Setor de patologia – Escola de Veterinária - UFMG

³ Universidade de Uberaba – Setor de patologia - UNIUBE

RESUMO

Conhecendo a problemática das condenações errôneas por boubá aviária e no intuito de fornecer contribuição ao Serviço de Inspeção Federal (SIF), objetivou-se esclarecer e estabelecer novos critérios técnicos de condenação para esta doença, utilizando-se da caracterização das lesões cutâneas em associação com critérios regionais já estabelecidos. A legislação brasileira para inspeção de carnes apresenta de forma dúbia a condenação de carcaças com boubá aviária. Dois artigos que constam no Regulamento da Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal apresentam destinos diferentes para um animal que é portador sintomático da doença. Utilizando-se das planilhas de condenação mensais cedidas pelo Serviço de Inspeção Federal foi realizado levantamento quantitativo de condenações por boubá aviária. 30 perus (*Meleagris gallopavo*) foram utilizados para coleta de fragmentos de pele com lesões. Estas foram fixadas em formol tamponado a 10%, embebidas em parafina, cortadas em seções de 5 µm e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para visualização em microscópio de luz clara. No ano de 2013, 16.830 perus foram condenados por boubá aviária, sendo 10.314 parcialmente e 6516 totalmente. O mês de março obteve o maior percentual condenado total e parcialmente com 40,38% e 2,59%. A avaliação histopatológica das lesões revelou hiperplasia epitelial, degeneração hidrópica com células apresentando vacúolos e presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos

Autor para correspondência: ¹ Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Rua Ceará, s/n, Bloco 2D, Sala 43, Campus Umuarama, Uberlândia, MG, 38402 018 Brasil. pauloufu@hotmail.com

também chamado de corpúsculo de Bollinger, considerado sinal patognomônico da doença. Considerando que é um vírus epiteliotrópico, e que em sua forma cutânea, provoca apenas lesões superficiais de pele em áreas desprovidas de penas, apenas essas áreas afetadas devem ser descartadas durante o abate. De acordo com as características macroscópicas e microscópicas das lesões cutâneas, não se justifica a condenação total das carcaças das aves acometidas pelo vírus da boubá aviária, e sim condenação parcial descartando apenas as lesões evidentes.

Palavras chave: Condenações, Fowlpox, Frigorífico matadouro, SIF.

ABSTRACT

Knowing the problem of erroneous condemnation for fowlpox and in order to provide assistance to the Federal Inspection Service (SIF), we aimed to clarify and establish new technical criteria for sentencing for this disease, using the characterization of skin lesions in association with regional criteria already established. Brazilian law for meat inspection presents a dubious way to the condemnation of carcasses with fowlpox. Two articles contained in the Sanitary Regulation of Animal Products Inspection have different destinations for an animal that is symptomatic carrier of the disease. Using the monthly sentencing worksheets provided by the Federal Inspection Service was conducted a quantitative survey of condemnations for fowlpox. Were used 30 turkeys (*Meleagris gallopavo*) to collect fragments of skin lesions. These were fixed in buffered formalin 10%, embedded in paraffin, cut into sections of 5 μm and stained with hematoxylin-eosin for viewing in microscope. In 2013, 16,830 turkeys were condemned by fowlpox, being 10,314 partially and 6,516 totally. The month of March had the highest percentage of total e partial condemnations, respectively with 40.38% and 2.59%. The histopathology of the lesions revealed epithelial hyperplasia, hydropic degeneration, with cells presenting vacuoles and presence of eosinophilic intracytoplasmic inclusion corpuscle also called Bollinger's corpuscle, considered a pathognomonic sign of the disease. Considering that it is an epitheliotropic virus, and that in its

cutaneous form causes only superficial skin lesions in areas devoid of feathers, only these affected areas should be discarded during slaughter. According to the macroscopic and microscopic characteristics of the skin lesions is not justified total condemnation of carcasses of birds affected by fowlpox, but partial condemnation discarding only the obvious injuries.

Key words: Condemnations, Fowlpox, Slaughterhouse, Federal Inspection Service.

INTRODUÇÃO

Bouba aviária é uma doença provocada por um *Avipoxvírus* pertencente à família *Poxviridae*. O fowlpox vírus (FPV) é espécie específica e sua nomenclatura segue de acordo com a espécie acometida, sendo principalmente estudados isolados de animais de produção como frangos, perus, codornas e canários. A doença tem sido relatada em mais de 200 espécies e afeta aves domésticas, de produção e de vida livre em todo o mundo (Ha *et al.*, 2013).

Após a infecção pelo *Avipoxvírus* duas fases são caracterizadas: uma resposta inicial do hospedeiro com hiperplasia celular marcante durante as primeiras 72 horas e síntese de vírus 72-96 horas após a infecção (Cheevers & Randall, 1968; Cheevers *et al.*, 1968). Como consequência da ação do vírus há formação de lesões proliferativas na pele, que são discretas e nodulares nas regiões desprovidas de pena (forma cutânea); ou lesões fibrino-necróticas e proliferativas na membrana mucosa do trato respiratório superior, boca e esôfago (forma mucosa ou diftérica) (Moço *et al.*, 2008). Também é possível a manifestação das duas formas na mesma ave, caracterizando a forma mista.



Figura 1. Peru (*Meleagris gallopavo*) com lesões nodulares na conjuntiva da pele da região da face, crista e junção mucocutânea sugestivas de boubá aviária.

Varíola aviária, epiteloma contagioso, molusco contagioso, difteria aviária e boubá aviária são nomenclaturas sinônimas, sendo boubá o nome usual em português (Van Riper & Forrester, 2007; Tripathy & Reed, 2008). No Brasil, Back *et al.* (1995) relataram boubá aviária em frangos de corte e Vargas *et al.* (2011) em coruja-de-igreja. É uma doença de ocorrência esporádica, colaborando para a escassez de informações a respeito. A boubá aviária é prevenida pela imunização de aves suscetíveis com cepas atenuadas de vírus proveniente de galinha ou vírus antigenicamente similares de pombos. (Van Riper & Forrester, 2007)

A legislação brasileira para inspeção de carnes apresenta de forma dúbia a condenação de carcaças com boubá aviária. Dois artigos que constam no Regulamento da Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal – RIISPOA (Brasil, 1962), apresentam destinos diferentes para um animal que é portador sintomático da doença.

O artigo nº 229 do RIISPOA dispõe que: “todas as aves que no exame *ante* ou *post-mortem* apresentem sintomas ou forem suspeitas de... difteria, cólera, varíola... em geral, devem ser condenadas”. Já o artigo nº 230 dispõe que: “as enfermidades tais como... coriza infecciosa, epiteloma contagioso... determinam rejeição total quando em período agudo ou quando os animais estejam em estado de magreza pronunciada” (Brasil, 1962).

A ausência de estudos, a duplicidade na normativa vigente e a ausência de padronização na nomenclatura da doença, são fatores contribuintes para a condenação desnecessária de carcaças com

lesões características de bouba aviária, reduzindo os índices de produtividade no setor avícola brasileiro.

Conhecendo a problemática das condenações errôneas por bouba aviária e no intuito de fornecer contribuição ao Serviço de Inspeção Federal (SIF), objetivou-se esclarecer e estabelecer novos critérios técnicos de condenação para esta doença, utilizando-se da caracterização das lesões cutâneas em associação com critérios regionais já estabelecidos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Histórico

O estudo foi conduzido em um matadouro frigorífico em colaboração com o SIF de Minas Gerais. Em janeiro de 2013 foi evidenciado por registros em mapas nosológicos, o aumento de condenações parciais de perus classificadas como “outras causas”. Estes animais eram condenados por apresentarem várias lesões de aspecto nodular em áreas desprovidas de penas, principalmente pescoço e cabeça, sugestivas de bouba aviária. Em março de 2013, após confirmação oficial pelo SIF, foi inserido o item “epitelioma contagioso”, nome similar à bouba aviária nas planilhas oficiais de condenação.

Desde então, as condenações foram estabelecidas de acordo com critério proposto pelo fiscal oficial do Serviço de Inspeção Federal, já que condenações por essa enfermidade até o momento eram inexistentes. As lesões foram divididas em graus de um a três, sendo que a quantidade numérica de lesões e a sua distribuição eram os critérios de avaliação para condenação parcial ou total.

Essa classificação se deu da seguinte forma: animais caracterizados com grau um, apresentavam de uma a três lesões nodulares disseminadas de forma isolada e eram condenados parcialmente; com grau dois animais com três a cinco lesões e condenados parcialmente; e grau três animais com mais de cinco lesões e/ou lesões aglomeradas eram condenados totalmente. Esta

classificação foi atribuída a lesões em estágio avançado e lesões em fase inicial, não eram consideradas.

Levantamento de condenações

Utilizando-se das planilhas de condenação mensais cedidas pelo Serviço de Inspeção Federal foi realizado levantamento quantitativo de condenações por boubá aviária (ou epiteloma contagioso, como descrito na planilha). Foi realizada a porcentagem dos condenados sobre o total condenado para quantificar a quantidade de aves descartadas total ou parcialmente.

Histopatologia

30 perus (*Meleagris gallopavo*) foram utilizados para coleta de fragmentos de pele com lesões. A coleta foi realizada utilizando bisturi e pinça estéril e uma lesão de cada animal era pinçada para a retirada de fragmentos contendo tecido sadio e tecido lesionado, sendo estes armazenados em formol tamponado 10%. O exame histopatológico foi realizado no Laboratório de Técnicas Histológicas da Universidade Federal de Uberlândia. As lesões foram fixadas em formol a 10%, embebidas em parafina, cortadas em secções de 5 µm e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para visualização em microscópio óptico. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética na utilização de animais, sob o número 199/13 protocolo de registro CEUA/UFU 125/13.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ano de 2013, 16.830 perus foram condenados por boubá aviária, sendo 10.314 parcialmente e 6516 totalmente. O mês de março obteve o maior percentual condenado total e parcialmente com 40,38% e 2,59 conforme Tabela 1.

Tabela 1. Percentual de condenações totais e parciais em perus por “epitelioma contagioso” em frigorífico matadouro em regime de Inspeção Federal em Minas Gerais, de dezembro de 2012 a dezembro de 2013. Fonte: Serviço de Inspeção Federal

	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez
Total	-	-	-	40,38	37,12	16,08	8,68	1,63	0,62	-	0,91	1,29	-
Parcial	-	-	-	2,59	2,13	0,70	0,43	0,08	0,01	-	0,04	0,05	1,36

A avaliação histopatológica das lesões (figura 1) revelou hiperplasia epitelial, degeneração hidrópica com células apresentando vacúolos e presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos também chamado de corpúsculo de Bollinger, considerado sinal patognomônico da doença, confirmando o diagnóstico de boubá aviária (Tripathy & Reed, 2008).

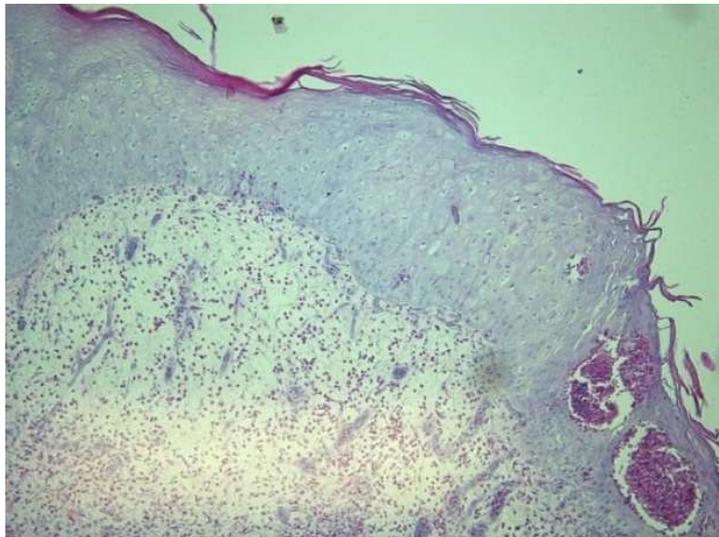


Figura 2. Peru. Histopatologia de lesões similares as apresentadas na Figura 1. A epiderme está intensamente espessa e há infiltrado inflamatório na epiderme e na derme. H&E x10.

A hiperplasia do epitélio é considerada característica importante no desenvolvimento das lesões de boubá aviária devido à existência de fator de crescimento epidérmico presente no genoma do Avipoxvírus, que participa na expressão dessa característica predominante (Tripathy & Reed, 2008). De acordo com Arhelger *et al.* (1962), os corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos estão presentes no tecido epitelial após 72 horas da infecção. Esses corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos eosinofílicos são encontrados em células infectadas com o vírus da

bouba aviária e consistem em agregados de partículas de vírus e também são locais de multiplicação do vírus (Eaves & Flewett, 1955).

Não existem relatos sobre ocorrência de bouba aviária em mamíferos. Tripathy & Reed (1997) afirmam que a bouba aviária é conhecida por não ter significância em saúde pública e não são conhecidos relatos de infecção em humanos. Berchieri & Marcari (2000) também afirmam que não é uma doença de interesse na saúde pública, e normalmente, não acomete mamíferos.

Sendo a bouba aviária uma doença sem correlação com saúde pública, não há necessidade de se condenar totalmente uma carcaça que apresente lesões externas, como determina o artigo nº 229 do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil, 1962). O mais adequado seria a condenação conforme artigo nº 230 onde: "... determinam rejeição total quando em período agudo ou quando os animais estejam em estado de magreza pronunciada." (Brasil, 1962).

Considerando que é um vírus epiteliotrópico, e que em sua forma cutânea, provoca apenas lesões superficiais de pele em áreas desprovidas de penas, apenas essas áreas afetadas devem ser descartadas durante o abate. Na ocorrência da forma diftérica da doença, o estado geral do animal já será suficiente para condená-lo como um animal caquético ou em aspecto repugnante. É necessária nomenclatura universal seja adotada para citação em legislação, visto que, bouba aviária, difteria aviária e varíola aviária são sinônimas e que a normativa existente gera dúvidas na condenação.

De acordo com as características macroscópicas e microscópicas das lesões cutâneas, não se justifica a condenação total das carcaças das aves acometidas pelo vírus da bouba aviária, e sim condenação parcial descartando apenas as lesões evidentes. Isso exceto nos casos em que animais portadores de bouba aviária apresentem caquexia e/ou aspecto repugnante, como previamente especificado nos regulamentos do SIF.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG e a CAPES, pelo financiamento da pesquisa e bolsa concedida.

Ao Serviço de Inspeção Federal pelo apoio.

REFERÊNCIAS

Arhelger RB, Darlington RW, Gafford LG, Randall CC. An electron microscopic study of fowlpox infection in chick scalps. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1962; 11:814-825.

Back A, Soncini RA, Ruthes O, Madureira Jr S, Flores R. An atypical fowl pox outbreak in broilers in southern Brazil. *Avian diseases* 1995; 4: 902-906.

Berchieri Junior A, Macari M. *Doenças das Aves*. FAPESP, Campinas. 333-338; 2000.

Brasil. Regulamento de inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). 1962. Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952, alterado pelo Decreto nº 1.255 de 25 de junho de 1962. *Diário Oficial da União*, 7 jul. 1962.

Cheevers WP, Randall CC. Viral and cellular growth and sequential increase of protein and DNA during fowlpox infection in vivo. *Experimental. Biology and Medicine* 1968; 127:401-405.

Cheevers WP, O'Callaghan DJ, Randall CC. 1968. Biosynthesis of host and viral deoxyribonucleic acid during hyperplastic fowlpox infection in vivo. *Journal of Virology*, 1968; 5:421-429.

Chiu WL, Chang W. Vaccinia virus J1R protein: a viral membrane protein that is essential for virion morphogenesis. *Journal of Virology* 2002; 76: 9575–9587.

Eaves G, Flewett TH. The structure of fowl-pox inclusions (Bollinger bodies). *Journal of Hygiene* 1955; 53(01), 102-105.

Ha HJ, Alley M, Howe L, Gartrell B. 2013. Evaluation of the pathogenicity of avipoxvirus strains isolated from wild birds in New Zealand and the efficacy of a fowlpox vaccine in passerines. *Veterinary Microbiology* 2013; 165:268-274.

Moço HF, Dias LC, Andolfato LHM, Alves ML, Bronzatto A, Raya DA. Boubá Aviária. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária* 2008; 11:1-5.

Tripathy DN, Reed WN. Pox. In: *Diseases of Poultry*, 10. ed, Ames: Iowa State University Press. 643-659; 1997.

Tripathy DN, Reed WN. Pox. In: *Diseases of Poultry*, 12. ed, Ames: Blackwell Publishing. 291-308; 2008.

Van Riper C, Forrester DJ. 2007. Avian pox, 131-171. In: *Infectious Diseases of Wild Birds*. (eds Thomas N. J., Hunter D. B. & Atkinson C. T.) Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA.

Vargas GD, Albano AP, Fischer G, Hübner S, Sallis SE, Nunes CF, Soares MP. Avian pox virus infection in a common barn owl (*Tyto alba*) in southern Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2011; 31:620-622.

APÊNDICE A – Comitê de ética

Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –

CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;

www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 199/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 125/13**

Projeto Pesquisa: “Elaboração de padrão de condenação para carcaças com
Bouba Aviária”.

Pesquisador Responsável: Paulo Lourenço da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com
animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da
pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

**OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO
DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE
ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.**

Uberlândia, 27 de setembro de 2013

APÊNDICE B – Normas para publicação - Revista Brasileira de Ciência Avícola

Escopo e política

A publicação da **Revista Brasileira de Ciência Avícola (Brazilian Journal of Poultry Science)** é coordenada pela comissão editorial da FACTA (Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas). Todas as conclusões e resultados publicados são de responsabilidade integral do(s) autor(es).

A **Revista Brasileira de Ciência Avícola (Brazilian Journal of Poultry Science)** é publicada trimestralmente e aceita apenas trabalhos originais de pesquisa que sejam relevantes à área de ciência avícola. As áreas consideradas para publicação são: Bioquímica e Biologia Celular; Construção, Ambiente e Bem-estar; Aves Silvestres; Produção e Manejo; Imunologia, Doenças Avícolas e Controle; Aves de Postura e Produção de Codornas; Nutrição; Fisiologia, Genética, Reprodução e Incubação; Tecnologia, Processamento e Segurança Alimentar.

O objetivo principal da Revista é o de publicar artigos científicos e técnicos completos, assim como revisões de literatura na área de ciência avícola, escritos por pesquisadores e especialistas da área. Os autores que gostariam de publicar uma revisão de literatura, um editorial ou uma revisão técnica devem entrar em contato com o editor da Revista.

Todos os manuscritos devem ser enviados em inglês e serão avaliados de modo confidencial e imparcial.

O envio de um manuscrito à Revista Brasileira de Ciência Avícola significa que:

1. O artigo nunca foi publicado.
2. O artigo não está sendo enviado para publicação em outro lugar.
3. Todos os autores aprovaram o envio do artigo a Revista Brasileira de Ciência Avícola.
4. Todos os autores obtiveram permissão para publicar por parte dos empregadores ou instituições às quais são filiados.
5. As permissões necessárias, incluindo a aprovação ética, foram obtidas. Serão desconsiderados os trabalhos que descrevam experimentos que demonstram uma falta de preocupação com os padrões éticos e de bem estar animal.

O manuscrito e outras correspondências devem ser enviados preferencialmente por e-mail: rvfacta@terra.com.br

Normas editoriais

Artigos científicos

O manuscrito deve conter os resultados de pesquisas originais que contribuem de modo relevante para o avanço da ciência avícola. Se alguma parte dos resultados já tiver sido publicada anteriormente como um resumo ou pequeno trabalho em algum evento científico, esta informação precisa constar no trabalho. Manuscritos que tragam novos conceitos, metodologias ou abordagens experimentais inovadoras terão prioridade.

O manuscrito deve ter as seguintes sessões: Título, Autor(es), Endereço para correspondência, Resumo, Palavras-chave, Introdução, Materiais e métodos, Resultados, Discussão, Referências e Agradecimentos que devem ser incluídos após a Discussão.

As sessões Resultados e Discussão podem ser apresentadas em conjunto. O resumo deve ter no máximo 250 (duzentas e cinquenta) palavras. As palavras-chave devem vir imediatamente após o

resumo, em ordem alfabética, devem ser no máximo 5 (cinco) e devem ser palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo do artigo.

Notas técnicas e Estudos de caso

Notas técnicas e estudos de caso devem ter a mesma estrutura de artigos científicos, incluindo as sessões (Introdução, Resumo, Material e métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos e Referências). Estas devem ser apresentadas em um texto com no máximo 1000 (mil) palavras, sem contar o Resumo e Referências, e não devem conter mais de três figuras e/ou tabelas.

Artigos técnicos

Artigos técnicos devem apresentar o desenvolvimento de novas metodologias e/ou técnicas que possam ser utilizadas de modo a contribuir para a área de ciência avícola. Estes artigos devem ter todas as sessões dos artigos científicos.

Editoriais e Revisões de convidados

Editoriais e Revisões de convidados serão publicadas somente através de convite. As revisões devem seguir as normas editoriais dos artigos científicos, porém sem as sessões Materiais e Métodos, Resultados e Discussão.

Apresentação dos artigos

1. Formato: cada manuscrito original deve ser devidamente identificado pelo título e nome(s) do(s) autor(es). A fonte utilizada deve ser Times New Roman (tamanhos de fonte: 16pt para o título, 14pt para os subtítulos no corpo do texto e 12pt para o corpo do texto), em espaçamento duplo e em papel A4 (21,0 x 29,7cm) com margens de 2 cm. As linhas e páginas devem ser numeradas consecutivamente. O manuscrito deve ser salvo em **.doc** (Microsoft Word ou editor de texto compatível). Somente nomenclaturas oficiais e reconhecidas serão aceitas. Abreviações não devem ser utilizadas no título.

2. folha de rosto: todos os manuscritos devem ter uma folha de rosto com o título, o(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) e a instituição de origem. Uma nota de rodapé com o endereço para correspondência completo e o e-mail do autor que deve ser incluído nesta página.

3. Tabelas: as tabelas devem ser numeradas consecutivamente em números indos-arábicos e devem ter um título descritivo. Todas as explicações devem ser dadas em uma legenda imediatamente abaixo da figura. Todas as abreviações que apareçam na tabela devem ser explicadas nesta legenda, mesmo que sejam também explicadas no corpo do texto. As tabelas devem poder ser compreendidas sem qualquer referência ao corpo do texto.

4. Ilustrações (fotografias, gráficos e desenhos): as ilustrações devem ser numeradas consecutivamente em números indos-arábicos e devem ser enviadas no mesmo documento (arquivo) mas em páginas separadas, que devem também trazer o nome do artigo, o(s) nome(s) do(s) autor(es) e a indicação do local no corpo do texto onde a ilustração deve aparecer. Fotografias, figuras e material escaneado devem ser enviados em alta resolução (no mínimo 600 dpi) e no formato **.tif** ou **.jpg**. As figuras serão publicadas em preto e branco. Um acordo em relação aos custos da impressão colorida deve ser firmado caso o autor deseje publicar as ilustrações coloridas.

5. Unidades: o Sistema Internacional de Unidades (SI) deve ser usado para medidas e abreviações.

6. Referências: as referências devem aparecer em ordem alfabética de acordo com o sobrenome do autor. A lista completa de referências deve ser mencionada. Todos os autores de cada artigo devem ser citados.

Exemplos:

Bakst MR, Gupta K, Akuffo V. Comparative development of the turkey and chicken embryo from cleavage through hypoblast formation. *Poultry Science* 1997; 76(1):83-90.

Bouzoubaa K, Nagaraja KV. Epidemiological studies on the incidence of salmonellosis in chicken breeder/hatchery operations in Marocco. In: Snoeyenbos GH, editor. *Proceedings of the International Symposium on Salmonella*; 1984; Kenneth Square, PA: American Association Avian Pathologists; 1985. p.337.

Briceno WNO, Guimarães FCR, Cruz FGG. Efeitos da densidade populacional de frangos de corte em época quente no município de Manaus. In: 10o Congresso Brasileiro de Avicultura; 1987; Natal, Rio Grande do Norte. Brasil. p. 131-2.

Gabriel JE. Efeitos do nível energético da ração e do estresse térmico na expressão da proteína de choque térmico Hsp70 e nos níveis do seu mRNA no fígado de frangos de corte em diferentes estágios de desenvolvimento. [Dissertation]. Jaboticabal (SP): Universidade Estadual Paulista; 1996.

Ginsburg M. Primordial germ cell development in avians. *Poultry Science* 1997; 76(1):91-5.

Simon VA, Oliveira C. Vacinação em avicultura através da água de bebida. In: Macari M, editor. *Água na avicultura industrial*. Jaboticabal: Funep-Unesp; 1996. p. 73-85.

Summers JD, Leeson S. *Commercial poultry nutrition*. 2 ed. New York; N.Y / State Manual Book & Periodical Services; 1997.

7. Citações no corpo do texto: o sobrenome do autor deve ser seguido pelo ano em parênteses. No caso de dois autores, os dois sobrenomes devem aparecer. No caso de mais de dois autores, a citação deve ser feita usando-se o sobrenome do primeiro autor seguido pela expressão *et al.* (em itálico).

Exemplos: Simon (1996)

Silva & Silva (1988)

Briceno *et al.* (1987)

8. nomes científicos de microorganismos: seguir as recomendações do Berg's Manual.

9. Taxas: as taxas para publicação variam de US\$30.00 a US\$ 50.00 por página editada, dependendo do tipo de revisão feita e dependendo se o autor é ou não assinante da Revista Brasileira de Ciência Avícola. Autores estrangeiros só poderão pagar através de Cartão de Crédito.

10. Versão editorada: Uma versão editorada e diagramada será enviada ao autor cujos dados para correspondência aparecem na página de rosto do manuscrito. Eventuais correções feitas pelo autor nesta versão devem ser retornadas em até três dias, preferencialmente via fax. O editor se reserva o direito de enviar o manuscrito para a impressão sem o envio da versão editorada ao autor. O editor não deve ser considerado responsável por eventuais erros que apareçam no artigo publicado.

11. Direitos autorais: a transferência dos direitos autorais do artigo à FACTA é uma das condições para publicação na Revista Brasileira de Ciência Avícola. Os autores podem usar o artigo após a publicação sem autorização prévia da FACTA contanto que os devidos créditos sejam dados à Revista como o local original de publicação. Os autores são responsáveis pela obtenção de permissões para reproduzir no artigo materiais de outras fontes que sejam protegidos por direitos autorais.