

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

CLAUDIA NIEMEYER

**Investigação de enfermidades virais selecionadas em
aves marinhas da Costa Atlântica da América do Sul**



SÃO PAULO
2014

CLAUDIA NIEMEYER

Investigação de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas na costa Atlântica da América do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Patologia

Área de concentração:

Patologia Experimental e Comparada

Orientador:

Prof. Dr. José Luiz Catão-Dias

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2015

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 033814

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.3047
FMVZ

Niemeyer, Claudia

Investigação de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas na costa Atlântica da América do Sul / Claudia Niemeyer. -- 2014.
121 p. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Patologia, São Paulo, 2014.

Programa de Pós-Graduação: Patologia Experimental e Comparada.

Área de concentração: Patologia Experimental e Comparada.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Catão Dias.

1. Enfermidades virais emergentes. 2. Herpesvirus. 3. Poxvirus. 4. Coronavírus. 5. Aves marinhas.
I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Monitoramento de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas do Atlântico Sul", protocolado sob o nº 8819081014, utilizando 600 (seiscentas) aves marinhas, sob a responsabilidade Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, foi aprovado "ad referendum" e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Monitoring of selected viral diseases in seabirds along the South American Atlantic Coast" protocol number 8819081014, utilizing 600 (six hundred) seabirds, under the responsibility Prof. Dr. José Luiz Catão Dias, was approved "ad referendum" and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 31 de outubro de 2014.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36250-5	Data da Emissão: 16/04/2014 11:21	Data para Revalidação*: 16/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CLAUDIA NIEMEYER	CPF: 282.611.748-32
Título do Projeto: Patologia comparada de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas de vida livre e em processo de reabilitação no litoral brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta e envio de amostras biológicas	09/2012	07/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso ao patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Recomenda-se que a quantidade de sangue a ser coletada não ultrapasse um por cento do peso dos indivíduos amostrados.
2	1. Recomenda-se que a quantidade de sangue a ser coletada não ultrapasse um por cento do peso dos indivíduos amostrados. 2. As publicações resultantes deste estudo devem ser encaminhadas a gestão do PARNA Abrolhos.
3	Conforme já procedido em ocasiões anteriores, as atividades de campo no Parque Nacional devem ser combinadas com a chefia da unidade para maximizar os esforços e evitar conflitos com o projeto "Monitoramento dos Sítios Reprodutivos e Caracterização do Uso do Mar por Aves Marinhas no Arquipélago dos Abrolhos" realizado em parceria com o CEMAVE e Avidépa.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Cristiane Kiyomi Miyaji Kolesnikovas	coleta de amostras biológicas	176.142.858-67	15481877 SSP-SP	Brasileira
2	RODOLFO PINHO DA SILVA FILHO	coleta de amostras biológicas	401.790.010-00	6006891052 SSP-RS-RS	Brasileira
3	IGOR DA CUNHA LIMA ACOSTA	coleta de amostras biológicas	369.281.478-06	379715284 SSP-MS	Brasileira
4	Cristiane Lassávia Nascimento	coleta de amostras biológicas	014.792.837-03	209539938 ssp-SP	Brasileira
5	Martha Lima Brandão	coleta de amostras biológicas	029.282.627-33	101388106 IFP-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 27462643





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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36250-5	Data da Emissão: 16/04/2014 11:21	Data para Revalidação*: 16/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CLAUDIA NIEMEYER	CPF: 282.611.748-32
Título do Projeto: Patologia comparada de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas de vida livre e em processo de reabilitação no litoral brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

6	Priscilla Maracini	coleta de amostras biológicas	169.546.928-32	243245579 SSP-SP	Brasileira
7	PATRICIA PEREIRA SERAFINI	coleta de amostras biológicas	027.472.819-22	66214524 SESP-PR	Brasileira
8	Katia Regina Groch	coleta de amostras biológicas	739.751.419-72	9080491955 SSP POA-RS	Brasileira
9	Juliana anaya sinhorini	coleta de amostra biológica	219.716.708-12	249912922 ssp-SP	Brasileira
10	Marina Galvão Bueno	pesquisadora	251.174.338-82	23878020-x SSP/SP-SP	Brasileira
11	José Luiz Catão Dias	coordenador	029.597.888-00	8914397-8 SSP-SP-SP	Brasileira
12	Juliana Marigo	pesquisadora	255.015.058-94	28136736x SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		BA	PARQUE NACIONAL MARINHO DOS ABROLHOS	UC Federal
2		RS	Litoral do Rio Grande do Sul	Fora de UC Federal
3		SC	CETEAS do Núcleo de Fauna do IBAMA	Fora de UC Federal
4		SP	Litoral de São Paulo	Fora de UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Oceanites, Sterna, Fregata magnificens, Phoebetria, Macronectes, Thalassarche, Oceanodroma, Phaethon, Spheniscus, Sula, Diomedea, Fregata minor, Phoebastria
2	Coleta/transporte de amostras biológicas ex situ	Phoebastria, Phaethon, Oceanodroma, Oceanites, Macronectes, Diomedea, Thalassarche, Sula, Phoebetria, Puffinus, Fregata minor, Fregata magnificens, Spheniscus, Sterna
3	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Fregata magnificens, Thalassarche, Sula, Sterna, Spheniscus, Puffinus, Phoebetria, Phoebastria, Fregata minor, Oceanodroma, Oceanites, Macronectes, Diomedea, Phaethon

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Fezes, Outras amostras biológicas(swab cloacal e swab traqueal), Animal encontrado morto ou partes (carcaça)/osso/pele, Fragmento de tecido/órgão, Sangue
2	Método de captura/coleta (Aves)	Puçá, Captura manual

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 27462643



Página 2/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36250-5	Data da Emissão: 16/04/2014 11:21	Data para Revalidação*: 16/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CLAUDIA NIEMEYER	CPF: 282.611.748-32
Título do Projeto: Patologia comparada de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas de vida livre e em processo de reabilitação no litoral brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 27462643



Página 3/4



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

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 36250-5	Data da Emissão: 16/04/2014 11:21	Data para Revalidação*: 16/05/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: CLAUDIA NIEMEYER	CPF: 282.611.748-32
Título do Projeto: Patologia comparada de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas de vida livre e em processo de reabilitação no litoral brasileiro	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 27462643



FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: NIEMEYER, Claudia

Título: Investigação de enfermidades virais seleccionadas em aves marinhas na costa Atlântica da América do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

À todas as aves marinhas.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais, irmãos, cunhada e sobrinha por compreenderem a minha ausência em vários momentos, e por me apoiarem mesmo sem entender onde eu queria chegar. Ao meu pai, Claudio Niemeyer, muito obrigada por me incentivar sempre a buscar meus objetivos e meus sonhos, por ser um exemplo de caráter e determinação, pelo suporte financeiro e pelo amor constante.

Ao meu orientador, Professor Dr. José Luiz Catão Dias, por quem tenho enorme carinho, respeito e admiração. Obrigada não somente pela orientação, mas pela paciência e dedicação durante todas as etapas deste trabalho, além do incentivo, confiança e ensinamentos em todos os setores da minha vida. Muito obrigada pelo seu apoio e carinho quando eu mais precisei.

Ao meu co-orientador Professor Dr. Paulo Brandão pela generosidade em disponibilizar seu laboratório de pesquisa, sua equipe e seu tempo para me ensinar e orientar em toda parte molecular dessa tese.

Ao Professor Dr. Mário Binelli por me ensinar a fazer pesquisa desde a época da graduação, por me mostrar um caminho de excelência no qual eu tento me manter até hoje.

À Dra. Marta B. Guimarães, por me ensinar tanto sobre a clínica de aves, pelos conselhos, pela amizade e pelo apoio profissional. Foi um privilégio ter trabalhado e aprendido tanto contigo.

Ao Professor Doutor H.L. Shivaprasad, por quem tenho enorme admiração e respeito por ter me acolhido tão bem em seu laboratório na Califórnia-EUA, por se preocupar sempre com meu bem estar e meu aprendizado constante. Muito obrigada por tudo.

À Pesquisadora Doutora Cíntia Maria Favero, por toda a paciência, disponibilidade, ensinamentos e entusiasmo ao longo desta jornada. Obrigada por estar sempre presente quando eu precisei de ajuda e acima de tudo, muito obrigada por cuidar tão bem de um dos meus bens mais preciosos.

Às Pesquisadoras Doutoradas Juliana Marigo, Marina Bueno, Kátia Groch e Giselle Ayres, as quais eu tive o prazer de conhecer e conviver ao longo desta jornada. Cada uma de vocês teve um papel fundamental nestes últimos anos da minha vida e me ajudaram muito a chegar até aqui. Muito obrigada pela amizade e por fazer parte da minha vida tanto profissional quanto pessoal.

Às Pesquisadoras Marcela Uhart e Virginia Rago pela amizade, pela oportunidade e pelo companheirismo nas expedições patagônicas.

Aos Pesquisadores Doutor Ariel Pereda e Doutora Maria Isabel Craig por disponibilizarem seu laboratório de pesquisa e possibilitar a realização de parte deste trabalho na Argentina, além do apoio e disponibilidades de vocês.

A todos os responsáveis pelas instituições parceiras deste projeto Drs. Cristiane Kolesnikovas, Cristiane Lassálvia, Pryscilla Maracini, Renata Bhering, Rodolfo Pinho Silva Filho e César Musso pela confiança no meu trabalho, pela parceria e pela disponibilidade de vocês ao longo destes quatro anos de projeto. Sem vocês grande parte deste trabalho não teria acontecido.

Ao Jay Holcomb (*in memoriam*), Shannon Riggs, Vann Masvidal, Monte Merrick, Michelle Bellizzi, Marie Travers e a toda a equipe do IBRC (International Bird Rescue Center) por me ensinarem tanto sobre aves aquáticas e marinhas. Em especial ao Jay Holcomb por me ceder a foto da capa e me contagiar com a sua paixão por essas aves maravilhosas.

Ao técnico de laboratório Jorge Okagawa por me ajudar com a organização dos materiais e amostras das expedições, e as técnicas Sheila e Sueli pela paciência, pela disponibilidade e pelos ensinamentos em biologia molecular.

Aos amigos lapconianos: Alexander Puerto, Ana Carolina Ewbank, Angélica Sarmiento, Camila Molina, Carlos Sacristan, Catia Dejuste, Fabíola Prioste, Juliana Marigo, Jorge Oyakawa, Kátia Groch, Laura Reisfeld, Marcelo Carvalho, Marco Gattamorta, Omar G. Viera, Ralph Vanstreels, Rosely Gioia, Samira Costa, Sândara Sguario, Sávio Sant'Anna, Silmara Rossi e Valéria Ruoppolo. É um orgulho fazer parte desta equipe.

Aos amigos do laboratório de biologia molecular Iracema Barros, Patrícia, Nara Thiers, Juliana Aguiar, Hebert Soares pela receptividade, por sempre estarem dispostos a ajudar, em vários momentos da execução deste projeto.

Aos funcionários da biblioteca Virginie Buff D'Apice sempre dispostos em ajudar, em especial à Elena Tanganini, Elza Faquim, Evadne Azeredo e Michelle Alves.

Às minhas amigas Juliana Sinhorini, Larissa Fonseca, Carolina Guimarães, Sybelle Scodelário, Adriana Caroli, Laura Noda, Erika Longo, Liliane Amarante, Karen Bock, Yara A. Andreatta, Daniela Mello pelo apoio, suporte emocional e incentivo durante a realização desta pesquisa, sem a ajuda de vocês não teria conseguido.

A pesquisadora Mestre Patrícia Serafini e a todos os pesquisadores do Cemave pelas licenças e apoio nas viagens de campo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A todos que colaboraram direta e indiretamente para a conclusão desta tese. Certamente sozinha eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada!

Este trabalho foi desenvolvido conjuntamente com o Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM), do Departamento de Patologia-FMVZ-USP e com o Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Preventiva-FMVZ-USP.

Foto da Capa: (HOLCOMB, J., 2008)

“O fim de uma viagem é apenas o começo de outra...

É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

(José Saramago)

RESUMO

NIEMEYER, C. **Investigação de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas na costa Atlântica da América do Sul.** [Selected viral diseases survey in seabirds along the South American Atlantic Coast]. 2014. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Doenças infecciosas emergentes se caracterizam como enfermidades cujos patógenos evoluíram para uma nova cepa ou genótipo capaz de infectar tanto o mesmo hospedeiro quanto uma nova espécie. A ocorrência de doenças emergentes tem sido correlacionada à destruição de habitats e à perda de biodiversidade. As aves marinhas têm sido consideradas bons indicadores e sentinelas do ecossistema aquático, e uma ampla variedade de enfermidades virais têm sido investigadas e descritas em aves no mundo todo. A caracterização e o entendimento das enfermidades virais que acometem as aves marinhas que habitam a costa brasileira são de fundamental importância para a compreensão de possíveis surtos de mortalidade dentre outros fatores que interferem na conservação das aves em geral. O objetivo desta pesquisa foi investigar a ocorrência de herpesvírus, avipoxvírus e coronavírus nas espécies de aves marinhas que foram reabilitadas em três centros localizados ao longo da costa brasileira e nas colônias reprodutivas de *Sula* sp. e *Phaeton* sp. localizadas no arquipélago de Abrolhos, Bahia, Brasil, e em quatro colônias de *Spheniscus magellanicus* localizadas na Patagônia argentina. As análises virais foram realizadas pela técnica de PCR e RT-PCR e confirmadas pela reação de sequenciamento do amplicon identificado. Nos casos de óbito, as alterações histopatológicas foram identificadas por meio de análise microscópica. O estudo revelou a ocorrência dos três agentes virais identificados em centros de reabilitação no Brasil, além da ocorrência de herpesvírus nas populações de vida livre e ativas em seus sítios reprodutivos. Foram identificados quatro novos herpesvírus denominados: *Magellanic penguin herpesvirus 1* (MagHV-1) causador de um surto de mortalidade associado a traqueíte necrótico-hemorrágica em pinguins de Magalhães em reabilitação; *Magellanic penguin herpesvirus 2* (MagHV-2), identificado em pinguins de Magalhães aparentemente saudáveis nas colônias reprodutivas da Patagônia argentina; *Sulid herpesvirus 1* (SuHV-1), identificado em atobás (*Sula* sp.) e grazinas (*Phaeton* sp.) nas colônias reprodutivas de Abrolhos e *Thalassarchid herpesvirus 1* (ThHV-1), identificados em um albatroz de nariz amarelo (*Thalassarche chlororhynchos*) nas praias de Rio Grande, RS, Brasil. Também foram identificados: um novo avipox, denominado *Brazilian penguinpox*, causador de lesões cutâneas, esofágicas e respiratórias nos pinguins de Magalhães

cutâneas, esofágicas e respiratórias nos pinguins de Magalhães em reabilitação em Santa Catarina e a identificação de dois *Gammacoronavirus* em três diferentes espécies assintomáticas que estavam em reabilitação em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. Os dados obtidos constituem uma base de informação útil para estudos futuros no campo da patologia, virologia, epidemiologia e dos impactos antrópicos na saúde das aves marinhas do cone sul.

Palavras-chave: Enfermidades virais emergentes. Herpesvirus. Poxvirus. Coronavirus. Aves marinhas.

ABSTRACT

NIEMEYER, C. **Selected viral diseases survey in seabirds along the South American Atlantic Coast.** [Investigação de enfermidades virais selecionadas em aves marinhas na costa Atlântica da América do Sul]. 2014. 121 p. Tese (Doutorado em Ciências)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Emerging infectious diseases are characterized as disease whose pathogens progressed to a new strain or genotype capable of infecting the same host or a new species. The occurrence of emerging diseases has been correlated to the destruction of habitats and loss of biodiversity. Seabirds have been considered as good indicators and sentinels of aquatic ecosystem, and a wide variety of viral diseases have been investigated and described in birds worldwide. The characterization and understanding of viral diseases that affect seabirds that inhabit the Brazilian coast are of fundamental importance for the understanding of possible mortality outbreaks among other factors that influence the conservation of birds in general. The objective of this research was to investigate the occurrence of herpesvirus, coronavirus and avipoxvirus in seabird species that were rehabilitated in three centres located along the Brazilian coast and in breeding colonies of *Sula* sp. and *Phaeton* sp. located at the Abrolhos's archipelago, Bahia, Brazil and four *Spheniscus magellanicus*'s colonies located at Argentina's Patagonia. Viral analyzes were performed by PCR and RT-PCR and confirmed by sequencing the identified amplicon. In cases of death, the histopathological alterations were identified through optical microscopic analysis. The study revealed the occurrence of the three investigated viral agents in the Brazilian rehabilitation centres, besides the occurrence of herpesvirus in the freelifing and reproductive active seabird's populations. Four new herpesvirus were identified and called: *Magellanic penguin herpesvirus 1* (MagHV-1), causing a mortality outbreak associated with necrotic-hemorrhagic tracheitis in Magellanic penguins in rehabilitation process; *Magellanic penguin herpesvirus 2* (MagHV-2), identified in apparently healthy breeding Magellanic penguins at the Argentinean Patagonia's colonies; *Sulid herpesvirus 1* (SuHV-1), identified in boobies (*Sula* sp.) and tropicalseabirds (*Phaeton* sp.) breeding colonies at Abrolhos Archipelago, and *Thalassarchid herpesvirus 1* (ThHV-1), identified in a yellow nose albatross (*Thalassarche chlororhynchos*) that appeared on the beaches of Rio Grande, RS, Brazil. Were also identified: a new avipox named *Brazilian penguinpox* causing cutaneous, esophagus and respiratory lesions in rehabilitation penguins at Santa Catarina and the identification of two

Santa Catarina and the identification of two *Gammacoronavirus* in three different asymptomatic seabirds species that were undergoing rehabilitation in Santa Catarina and Rio Grande do Sul. The data provide a useful information basis for further studies related to pathology, virology, epidemiology and human impacts on southern hemispheres seabirds' health.

Keywords: Emerging virus diseases. Herpesvirus. Avipoxvirus. Coronavirus. Seabirds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 -	<i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de Magalhães adulto)- Argentina-2014	35
Figura 1.2 -	Área de reprodução e de migração do pinguim de Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>)	36
Figura 1.3 -	<i>Thalassarche chlororhynchos</i> (albatroz de nariz amarelo)-[S.I.]- 2006	38
Figura 1.4 -	Locais de visualização do albatroz de nariz amarelo, <i>Thalassarche chlororhynchos</i> , ao longo da costa brasileira a partir de observadores a bordo de navios de pesca de espinhel. Dados do Projeto Albatroz-[S.I.]-2006	39
Figura 1.5 -	<i>Macronetes giganteus</i> (pardela gigante do sul)-Rio Grande-2010	40
Figura 1.6 -	Pontos de visualização oceânicos de <i>Macronectes</i> spp. (pardela gigante) na costa brasileira a partir de observadores a bordo de navios de pesca de espinhel (dados do Projeto Albatroz)-[S. I.]- 2006	41
Figura 1.7 -	<i>Sula leucogaster</i> (atobá marrom adulto)-Abrolhos-2013	43
Figura 1.8 -	<i>Sula leucogaster</i> (atobá marrom juvenil)-Abrolhos-2013	43
Figura 1.9 -	<i>Sula dactylatra</i> (atobá branco)-Abrolhos-2013	44
Figura 1.10 -	<i>Phaeton aethereus</i> (grazina de bico vermelho)-Abrolhos-2013	46
Figura 3.1 -	Ilhas do Arquipélago de Abrolhos-Abrolhos, Bahia-2013	53
Figura 3.2-	Mapa geográfico com a localização dos Parques Nacionais e Unidades de Conservação no sul do estado da Bahia	54
Figura 3.3-	Exemplar de <i>Phaeton aethereus</i> (grazina de bico vermelho) sendo pesada com uso de dinamômetro e saco de TNT (Tecido Não Tecido) Abrolhos-2013	55
Figura 3.4-	Colheita de sangue pela punção da veia ulnar medial de uma <i>Sula</i> <i>dactylatra</i> (atobá branco)-Abrolhos-2013	55
Figura 3.5-	Colheita de <i>swab</i> traqueal de um exemplar de <i>Sula dactylatra</i> (atobá branco)-Abrolhos-2013	56
Figura 3.6-	Colheita de <i>swab</i> cloacal de um exemplar de <i>Sula dactylatra</i> (atobá branco)-Abrolhos-2013	56
Figura 3.7-	Soltura de um exemplar de <i>Phaeton aethereus</i> (grazina de bico vermelho) após colheita de amostras biológicas- Abrolhos-2013	57

Figura 3.8-	Colônias reprodutiva de <i>S. magellanicus</i> na Patagônia argentina.- Cabo Dos Bahías-2014.....	58
Figura 3.9-	Localização geográfica das colônias reprodutivas (assinaladas com as setas) amostradas na Província de Chubut-Argentina-2014	59
Figura 3.10-	Ninhego de <i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de Magalhães)-Bahía Bustamante-2012	60
Figura 3.11-	Punção da veia jugular de um exemplar de <i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de Magalhães)-Bahía Bustamante-2012.....	60
Figura 3.12-	Pesagem de <i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de Magalhães)-Bahía Bustamante-2012.	61
Figura 3.13-	Localização geográfica dos centros de reabilitação que forneceram amostras de aves marinhas para este Projeto-São Paulo-2014	62
Figura 4.1-	Hiperplasia e necrose do epitélio traqueal de pinguim de Magalhães (<i>Spheniscus magellanicus</i>) com células sinciciais (seta) e inclusões intranucleares anfófilicas. H&E.....	77
Figura 4.2-	Pulmão de <i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de Magalhães) apresentando pneumonia piogranulomatosa com presença de células gigantes (seta). H&E.-São Paulo-2012.....	78
Figura 4.3-	Saco aéreo de <i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de Magalhães) apresentando espessamento, corpúsculos de inclusão anfófilicos (setas) e colônias bacterianas. H&E.-São Paulo-2012	78
Figura 4.4-	Microscopia eletrônica de transmissão em cortes de epitélio traqueal de <i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de Magalhães) demonstrando virions primários de herpesvírus com nucleocapsídio envolto por uma única membrana-Davis-2013	79
Figura 4.5-	Microscopia eletrônica de transmissão em epitélio traqueal de um <i>Spheniscus magellanicus</i> (pinguim de magalhães) demonstrando virions de herpesvirus maduros com envelopes (126 a 149 nm) e outros imaturos sem a presença do envelope lipídico (99.6 a 108 nm). Bar = 100nm-Davis, EUA-2013.	79
Figura 4.6-	Ensaio imuno-histoquímico negativo para anticorpo monoclonal murinho anti- <i>Gallid herpesvirus 1</i> em corte de traqueia de pinguim de Magalhães. Hematoxilina de Mayer-Davis-2013	80
Figura 4.7-	Controle positivo da imuno-histoquímica para <i>Gallid herpesvirus 1</i> realizada em corte de traquéia em amostras de galinhas (<i>Gallus gallus</i>) Hematoxilina de Mayer-Davis-2013.....	80

- Figura 4.8- Análise filogenética do *Magellanic penguin herpesvirus1* identificado em macerado de traqueia de pinguins de Magalhães no Rio Grande do Sul, Brasil. A árvore contendo sequências de 136 aminoácidos de representantes das três subfamílias virais foi gerada pelo método de *Neighbour-joining* com 1000 repetições de *bootstraps*..... 81
- Figura 5.1- Análise filogenética dos *Herpesvirus* identificados (destacados em quadros vermelhos) em *swabs* de traqueia e macerados de aves marinhas ao longo da costa Atlântica da América do Sul. A árvore contendo sequências de 100 aminoácidos de representantes das três subfamílias virais foi gerada pelo método de *Neighbour-joining* com 1000 repetições de *bootstraps*.....93
- Figura 6.1- Lesão verrucosa nodular em região de bico e pálpebra (A) do pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) SC286 oriundo de Santa Catarina e (B) lesão palpebral do genótipo ES134 KC 588962 identificado no Espírito Santo.-Florianópolis e Vitória-2012..... 99
- Figura 6.2 - Lesão cutânea em pinguim de Magalhães demonstrando distensão do citoplasma de células epiteliais com degeneração balonosa e presença de grandes inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas envoltas por um alo branco consistentes com Corpúsculos de Bollinger. H & E.-São Paulo-2012. 99
- Figura 6.3 - Epitélio bronquiolar de um pinguim de Magalhães apresentando inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas, corpúsculo de Bollinger, e broncopneumonia linfoplasmocítica, demonstrando que esta estirpe viral pode ser tão virulenta quanto a estirpe causadora de pneumonia descrita em canários. H & E.-São Paulo-2012.....100
- Figure 6.4 - Epitélio esofágico de um pinguim de Magalhães demonstrando a presença de corpúsculos de inclusão citoplasmáticos e eosinofílicos, corpúsculos de Bollinger, e infiltrado linfoplasmocítico devido a infecção pelo *Brazilian penguinpox*. H&E.-São Paulo-2012.....101
- Figura 6.5 - Árvore filogenética de nucleotídeos de fragmentos (579pb) do gene codificante da proteína 4b do capsídeo viral do *Avipoxvirus*. Construída pelo algoritmo de *Neighbour-joining* e o modelo MCL com 1,000 repetições. As sequências (KC588955 - KC588962) foram identificadas neste estudo e alinhadas com 34 sequências de

avipoxvirus disponíveis no Genbank que representam os 11 diferentes clados (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, B1, B2, B3 and C). Amostras sinalizadas com o símbolo ▼ representam as sequências adquiridas em amostras de pinguim (*Spheniscus magellanicus*) coletadas nos estados de Santa Catarina (SC) e Espírito Santo (ES), Brasil. As sequências de referência estão disponíveis em Manarolla et al., (2010) e Gyuranecz et al., (2013). 103

Figura 7.1- Análise filogenética dos fragmentos de 136pb da região 3'UTR não codificante de coronavírus aviários identificados em pinguins de Magalhães e petrel gigante em centros de reabilitação no Brasil (identificados com o símbolo ▲). A árvore, gerada pelo método de Neighbour-joining com 1000 repetições de bootstraps, contém outras 37 sequências disponíveis no Genbank que representam amostras dos gêneros *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*. 112

Quadro 1- Lista dos *primers* utilizados nas Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de patógenos..... 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1-	Espécies de aves marinhas de vida livre e em processo de reabilitação amostradas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul ao longo da costa brasileira e nas colônias reprodutivas da Patagônia argentina no período de julho de 2011 a janeiro de 2014 63
Tabela 5.1-	Números absolutos de amostras analisadas para a pesquisa de herpesvírus nas diferentes espécies de aves marinhas, distribuídas em função do local de colheita e idade. São Paulo, 2011/2013..... 87
Tabela 5.2-	Pesquisa de herpesvírus em aves marinhas, distribuídas em função do local de colheita, tipo de amostra, amostragem e positividade. São Paulo, 2011/2013 89

LISTA DE ESPÉCIES

NOME CIENTÍFICO	NOMES POPULARES
Ordem Anseriformes	
<i>Cygnus cygnus</i>	Cisne-bravo
Ordem Sphenisciformes	
<i>Sphenicus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães
<i>Aptenodytes patagonicus</i>	Pinguim rei
Ordem Procellariiformes	
<i>Pterodroma arminjoniana</i>	Grazina de Trindade; pardela de Trindade; fura-buxo
<i>Puffinus lherminieri</i>	Pardela de asa larga ou Pardela-de-Audubon
<i>Diomedea dabbenena</i>	Albatroz-de-tristão
<i>Diomedea sanfordi</i>	Albatroz-real-do-norte ou Albatroz-real-setentrional
<i>Thalassarche melanophris</i>	Albatroz-de-sobrancelha-negra
<i>Thalassarche chlororhynchos</i>	Albatroz-de-nariz-amarelo
<i>Phebetria fusca</i>	Piau-preto
<i>Diomedea exulans</i>	Albatroz-errante
<i>Macronectes giganteus</i>	Petrel gigante; pardela gigante; urubu-do-mar
Ordem Suliformes	
<i>Sula leucogaster</i>	Atobá marrom
<i>Sula dactylatra</i>	Atobá branco, atobá mascarado, ganso patola ou atobá grande
Ordem Pelecaniforme	
<i>Phaethon aethereus</i>	Rabo-de-palha-de-bico-vermelho
<i>Phaeton lepturus</i>	Rabo-de-palha-de-bico-laranja
<i>Fragata magnificens</i>	Fragata
<i>Ardeola bacchus</i>	Garça chinesa
Ordem Gaviiformes	
<i>Gavia immer</i>	Mobelha

Ordem Charadriiformes
Sterna hirundinacea

Trinta-reis de bico vermelho

Ordem Passeriformes

Erythrura gouldiae

Diamante-de-gould

SUMÁRIO

1.....	INTRODUÇÃO GERAL	31
1.1.....	AS AVES MARINHAS	33
1.1.1	Ordem Sphenisciformes; Família Sphenicidae	34
1.1.1.1	<i>Spheniscus magellanicus</i> (FOSTER, 1781).....	34
1.1.2	Ordem Procellariiformes	36
1.1.2.1	Família Diomedidae	37
1.1.2.1.1	<i>Thalassarche chlororhynchos</i> (GMELIN, 1789).....	38
1.1.2.2	Família Procellariidae	39
1.1.2.2.1	<i>Macronectes giganteus</i> (GMELIN, 1789)	40
1.1.3	Ordem Suliformes - Família Sulidae	42
1.1.3.1	<i>Sula leucogaster</i> (BODDAERT, 1783).....	42
1.1.3.2	<i>Sula dactylatra</i> (LESSON, 1831).....	44
1.1.4	Ordem Pelecaniformes; Família Phaethontidae	45
1.1.4.1	<i>Phaethon aethereus</i> (LINNAEUS, 1758).....	45
1.2AGENTES VIRAIS SELECIONADOS.....	46
1.2.1	Herpesvírus	46
1.2.2	Poxvírus	48
1.2.3	Coronavírus	49
2.....	OBJETIVO	51
2.1OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
3.....	MATERIAIS E MÉTODOS	52
3.1.....	COLETA DE AMOSTRAS	52
3.1.1	Arquipélago dos Abrolhos, Bahia	52
3.1.2	Colônias reprodutivas na Patagônia argentina	56
3.1.3	Centros de reabilitação	60
3.2ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	63
3.2.1	No Brasil	63
3.2.2	Na Argentina	63
3.3EXTRAÇÃO DE DNA.....	64
3.3.1	No Brasil	64
3.3.2	Na Argentina	65
3.4EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR	65
3.5REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)	65
3.5.1	Herpesvírus	66
3.5.2	Coronavírus	67
3.5.3	Poxvírus	67
3.6LEITURA E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR	68
3.7PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS.....	68
3.8ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS	69
3.9ANÁLISE FILOGENÉTICA	69
4.....	UM NOVO HERPESVÍRUS ASSOCIADO À LARINGOTRAQUEÍTE EM PINGUINS DE MAGALHÃES (<i>SPHENISCUS MAGELLANICUS</i>) NO SUL DO BRASIL	71
4.1INTRODUÇÃO	71
4.2.....	MATERIAIS E MÉTODOS.....	72
4.2.1	Histórico do Caso	72
4.2.2	Patologia	73

4.2.3	Microscopia Eletrônica	73
4.2.4	Imuno-histoquímica	73
4.2.5	Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e Análise Filogenética.....	74
4.3	RESULTADOS	75
4.3.1	Clínica e Patologia.....	75
4.3.2	Microscopia Eletrônica	76
4.4	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	80
	REFERÊNCIAS	82
5	HERPESVÍRUS EM AVES MARINHAS DA COSTA ATLÂNTICA DA AMÉRICA DO SUL.....	84
5.1	INTRODUÇÃO	84
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	85
5.2.1	Animais.....	85
5.2.5	PCR e Análise Filogenética.....	86
5.3	RESULTADOS	86
5.4	DISCUSSÃO.....	88
5.5	CONCLUSÃO	90
	REFERÊNCIAS	92
6	DOIS DIFERENTES AVIPOX VÍRUS ASSOCIADOS À BOUBA AVIÁRIA EM PINGUINS DE MAGALHÃES (<i>SPHENISCUS MAGELLANICUS</i>) AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA	93
6.1	INTRODUÇÃO	93
6.2	MATERIAIS E MÉTODOS	94
6.2.1	Histórico.....	94
6.2.2	Análise Patológica	95
6.2.3	Extração de DNA e amplificação por PCR.....	95
6.2.4	Clonagem dos amplicons obtidos.....	95
6.3	RESULTADOS	96
6.4	DISCUSSÃO.....	100
	REFERÊNCIAS	105
7	CORONA VÍRUS AVIÁRIO EM AVES MARINHAS NOS CENTROS DE REABILITAÇÃO DA REGIÃO SUL DO BRASIL.....	107
7.1	INTRODUÇÃO	107
7.2	MATERIAS E MÉTODOS.....	108
7.3	RESULTADOS	108
7.4	DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	109
	REFERÊNCIAS	113
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO GERAL

“Medicina da conservação” é o termo utilizado desde 1996 para definir uma nova ciência transdisciplinar que associa a saúde humana, a saúde animal e a saúde ambiental. Visa, por meio da pesquisa, de ações de manejo e de políticas públicas, garantir a manutenção da saúde de todas as comunidades biológicas e de seus ecossistemas (MANGINI, 2006; AGUIRRE, 2012). Este conceito holístico de saúde mundial, associando a ecologia aos conceitos básicos de saúde, permite uma melhor compreensão de como os impactos gerados tanto na cadeia ecológica, na perda da biodiversidade e na viabilidade dos processos ecológicos afetam todas as espécies, inclusive a humana.

Segundo Keesing et al. (2010), a eficiência dos ecossistemas diminui quando existe perda de biodiversidade, ou seja, diminuição na variedade genética e no número de espécies. Muitas espécies e ecossistemas estão sendo ameaçados por fatores antrópicos nos últimos anos. O aumento contínuo da população humana resulta em uma perda vertiginosa de biodiversidade. Atualmente, estima-se que a taxa de extinção das espécies seja 100 a 1000 vezes mais elevada que as taxas de extinção históricas; e estima-se também que em 50 anos essas taxas serão 10 a 100 vezes mais elevadas que as taxas atuais (KEESING, 2010; AGUIRRE, 2012). Espécies de todas as classes animais estão atualmente ameaçadas de extinção e, segundo Keesing et al. (2010), estima-se que desde 1970 a população geral de aves, mamíferos, anfíbios, répteis e peixes tenha diminuído em quase 30%. As principais causas desse enorme declínio populacional e dessas extinções são os impactos antrópicos e as alterações causadas nos ecossistemas do planeta devido ao aumento de demanda na produção de alimentos e na extração de água potável, matérias primas e combustíveis.

É indiscutível a importância dos oceanos para o equilíbrio ecológico e a saúde global. Além de cobrirem mais de 70% da superfície do planeta, os oceanos concentram uma enorme variedade de espécies, mantêm um grande estoque de alimentos e reservas minerais, e cerca de 60% da população humana vive à beira-mar ou próxima da costa. Atividades humanas tais como a sobrepesca, o desenvolvimento urbano, a alteração geográfica da costa, a poluição e a crescente produção de lixo estão alterando o ecossistema marinho de forma predatória, prejudicando sua capacidade produtiva e a saúde dos oceanos em geral (KNOWLTON, 2004; HALPERN, 2012).

Existem centenas de indicadores voltados a mensurar os vários aspectos das condições dos oceanos, sendo um deles o monitoramento de sua biodiversidade. As aves marinhas são consideradas bons indicadores sentinelas, uma vez que são componentes integrados do ecossistema aquático. Alimentam-se em diferentes níveis tróficos e, mesmo aquelas que não apresentam hábitos migratórios, costumam se deslocar por vastas áreas geográficas em busca de alimentos (MALLORY, 2010; HALPERN, 2012). Estudos demonstraram que as aves marinhas podem refletir seu hábitat tanto em alterações graves e agudas, por exemplo apresentando alta mortalidade em colônias ou aparecendo mortas na costa em casos de vazamento de petróleo, como em alterações fisiológicas crônicas e subclínicas, nos casos de acúmulo de toxinas, lixo e outros aspectos dos impactos antrópicos nos oceanos. Assim, o monitoramento da população de aves marinhas e/ou de seu sucesso reprodutivo configura um índice de resposta do ecossistema marinho às perturbações e impactos causados (MALLORY, 2010).

A destruição de habitats e a perda da biodiversidade geram um desequilíbrio ecológico e, entre outras consequências, podem acarretar alterações no padrão de transmissão de patógenos, aumento na incidência de doenças, emergência de novas doenças e introdução de espécies invasoras e novos patógenos (KEESING, 2010; AGUIRRE, 2012). Ainda, segundo Keesing et al. (2010), a transmissão de doenças aumenta quando ocorre perda na diversidade das espécies, mesmo que a densidade de hospedeiros se mantenha constante.

Doenças infecciosas emergentes se caracterizam como enfermidades cujos patógenos evoluíram para uma nova cepa ou genótipo capaz de infectar tanto o mesmo hospedeiro, como pode ser visto em relação à resistência de algumas bactérias aos antibióticos, quanto infectando novas espécies hospedeiras. Em alguns casos, a mudança de espécie infectada pode ampliar a distribuição geográfica de ocorrência do patógeno. O processo de emergir e se estabelecer em uma nova população hospedeira envolve algumas etapas, tais como: invasão inicial em uma nova espécie, *spillover*; produção de patógenos transmissíveis dentro do novo hospedeiro; estabilização do patógeno na nova população como um todo (KEESING, 2010).

Mudanças nos processos ecológicos e na biodiversidade podem interferir em todas as etapas desse processo. A degradação das florestas para a aquisição de terras cultiváveis, por exemplo, pode aumentar a aglomeração da fauna silvestre na mata remanescente e permitir a passagem de patógenos para novos hospedeiros. Sob o ponto de vista humano, estudos apontam que desde 1940 quase metade das zoonoses emergentes resultaram de alterações no uso do solo, mudanças na cadeia de produção de alimentos ou práticas agrícolas e interação

direta com a fauna silvestre, seja por meio da caça, do tráfico animal, ou mesmo do ecoturismo. Essas práticas aumentam a interação entre os seres humanos e a fauna selvagem, o que pode ser crítico para a maior ocorrência de *spillovers*. Uma vez que o patógeno consiga infectar o novo hospedeiro, o aumento da densidade populacional do novo hospedeiro pode facilitar a estabilização do patógeno na nova espécie (KEESING, 2010; AGUIRRE, 2012).

Um número crescente de aves marinhas chega anualmente às praias da costa Atlântica da América do Sul debilitadas devido à poluição oceânica por petróleo, impactos com a pesca, intoxicadas por maré vermelha, entre outros, e muitas delas são resgatadas e reabilitadas nos centros espalhados ao longo da costa (GARCÍA-BORBOROGLU, 2006, 2010). Uma vez que essas aves permanecem aglomeradas durante o processo de reabilitação, e que este processo intensifica o contato entre as espécies e dessas com o homem, torna-se importante a verificação da ocorrência ou não de doenças virais nessas aves. Também, o estudo e monitoramento da saúde das populações em vida livre reflete um panorama tanto da saúde do habitat onde essas aves estão inseridas, quanto justificam ou não a soltura de uma ave positiva para a presença de uma infecção viral latente. Assim, o presente trabalho objetivou estudar a ocorrência de três agentes virais que apresentam grande importância tanto para a população de aves marinhas em geral quanto para uma possível transmissão entre as diferentes espécies de aves.

1.1 AS AVES MARINHAS

As aves marinhas constituem um grupo de animais diversificado e extremamente adaptado ao seu ambiente, além de serem bons indicadores do estado de saúde e de conservação do ecossistema marinho (PIATT, 2007; PETRY, 2012). Segundo Branco et al. (2010), ao longo da costa brasileira podem ser encontrados exemplares de 148 diferentes espécies, pertencentes às cinco ordens de aves marinhas (Sphenisciformes, Procellariiformes, Pelecaniformes, Suliformes e Charadriiformes), que utilizam a costa brasileira em diferentes épocas do ano para alimentação e reprodução. Esse número evidencia a importância da plataforma continental brasileira para a conservação das aves marinhas e costeiras (COELHO, 1990; ALVES, 2004; EFE 2006; CBRO, 2011).

1.1.1 Ordem Sphenisciformes; Família Sphenicidae

São aves pelágicas e extremamente adaptadas ao ambiente marinho. Não voadoras, apresentam adaptações e morfologia diferenciada muito especializada para a vida oceânica, tais como ossos não pneumáticos, grande capacidade de mergulho, penas curtas e densas gerando uma camada impermeável, asas em formato de aletas que permitem remadas fortes e uma velocidade de natação de até 40 km/h. São as aves mais abundantes na região subantártica e antártica, constituindo 90% da biomassa da avifauna dessa região. Exclusivas do hemisfério sul, existem atualmente descritas 18 espécies de pinguins sendo o pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) o mais comumente encontrado na costa brasileira (SICK, 2001; CRANFIELD, 2003).

1.1.1.1 *Spheniscus magellanicus* (FOSTER, 1781)

Os pinguins de Magalhães (Figura 1.1), considerados quase ameaçados pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (International Union for Conservation of Nature), se reproduzem em colônias na Argentina (63 colônias), Chile (10 colônias) e Ilhas Falkland (Malvinas) e migram de março a setembro, tanto pela costa Atlântica quanto Pacífica da América do Sul, rumo ao norte (Figura 1.2) em busca de alimentos (ELLIS, 1998; BIRDLIFE, 2012). Durante a migração, afastam-se bastante da costa, permanecendo nos domínios da plataforma continental, cerca de 60 a 200km do litoral, onde as águas ainda não são tão profundas e ocorre uma maior abundância de peixes e cefalópodes (STOKES, 1998; SICK, 2001). Comumente migram até o Estado da Bahia ao longo da plataforma continental brasileira; porém, em 2011, um pinguim de Magalhães foi resgatado por pescadores no litoral do Ceará (SICK, 2001; O POVO, 2011).

Figura 1.1-*Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães adulto)-Argentina-2014

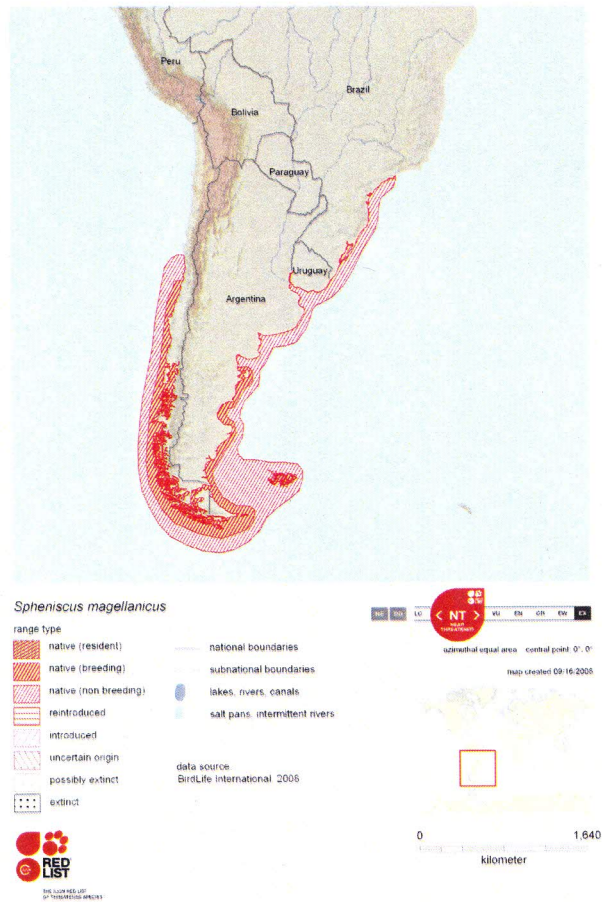


Fonte: (NIEMEYER, C., 2014)

Estima-se que a população total seja de aproximadamente 1.300.000 casais. A densidade populacional varia entre as colônias reprodutivas sendo que as maiores estão em território argentino. Acredita-se, todavia, que a colônia de Punta Tombo, localizada na província de Chubut, Argentina, apresente uma queda populacional de cerca de 30% desde 1987 (ELLIS, 1998).

Pinguins podem ser considerados sentinelas do ecossistema marinho, uma vez que são muito sensíveis às perturbações causadas em seu hábitat. Atualmente, acredita-se que as principais ameaças vividas pelos indivíduos da espécie sejam a contaminação dos oceanos por petróleo e seus derivados (GARCÍA-BORBOROGLU, 2006, 2010; RUOPPOLO, 2012), afogamento ou inanição devido à competição com a indústria pesqueira (CARDOSO, 2011) e as alterações climáticas (BOERSMA, 2014). Muitos pinguins encalham vivos ou mortos nas praias brasileiras todos os anos e muitos deles são resgatados por centros de reabilitação ao longo da costa, sugerindo que a costa brasileira seja uma importante área de ocorrência e mortalidade da espécie.

Figura 1.2-Área de reprodução e de migração do pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*)



Fonte: (BIRDLIFE, 2012)

1.1.2 Ordem Procellariiformes

Existem atualmente 46 espécies de aves descritas dentro desta Ordem, sendo todas elas aves pelágicas ou oceânicas. Apenas duas espécies de *Procellariiformes* se reproduzem em território brasileiro, a grazina de Trindade (*Pterodroma arminjoniana*), que nidifica na Ilha de Trindade, e a pardela de asa larga (*Puffinus lherminieri*), que nidifica no Arquipélago de Fernando de Noronha. Ambas as espécies apresentam perigo de extinção devido à destruição de hábitat e à predação por espécies invasoras em seus sítios de reprodução (NEVES, 2006). Dezesesseis outras espécies dessas aves marinhas utilizam a plataforma continental brasileira para se alimentar e, dessas, pelo menos cinco estão atualmente em perigo ou criticamente ameaçadas de extinção segundo a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN, sendo elas o albatroz de Tristão (*Diomedea dabbenena*), o albatroz real

do norte (*Diomedea sanfordi*), o albatroz de sobrançelha (*Thalassarche melanophris*), o albatroz de nariz amarelo (*Thalassarche chlororhynchos*) e o piau preto (*Phebetria fusca*) (IUCN, 2014).

A principal ameaça à existência dessas aves é a interação com a pesca oceânica e o uso de anzóis em espinhéis pelágicos (NEVES, 2006). Na tentativa de preservar esses animais o Ministério do Meio Ambiente (MMA), em parceria com organizações não governamentais (ONGs) e instituições internacionais, desenvolveu em 2003 o Plano de Ação Nacional para a Conservação de Albatrozes e Petreus (PLANACAP), unindo esforços para a conservação dessas aves e propondo medidas mitigatórias à pesca acidental (NEVES, 2006). Outras ameaças enfrentadas por estes habitantes do ecossistema marinho são a poluição por petróleo e seus derivados, a presença de lixo e plástico flutuante nas águas, a sobrepesca e o abandono de redes de pesca em alto mar (SICK, 2001).

Essas aves sobrevoam extensas áreas dos oceanos, e seus representantes podem ser vistos em águas brasileiras o ano todo, em sua maioria indivíduos sexualmente imaturos. O número de avistagens dessas aves pode aumentar de março a setembro, uma vez que as tempestades de inverno sobre o oceano Atlântico as forçam em direção ao continente (SICK, 2001). Nessa época pode-se verificar a presença de albatrozes juntamente com pardelas e atobás (*Sula* sp) (SICK, 2001), e é também quando algumas dessas aves acabam sendo resgatadas em centros de reabilitação ao longo da costa.

1.1.2.1 Família Diomedidae

A família contém as aves voadoras com as maiores envergaduras do mundo, sendo que o albatroz errante (*Diomedea exulans*) pode apresentar uma envergadura de até 3,7 metros (NEVES, 2006). Possuem asas longas, rígidas e estreitas não separando as penas primárias entre si e apresentando grande número, de 38 a 40, de pequenas e curtas penas secundárias. São planadores e para decolar correm vários metros sobre a água. Não batem as asas e para voar utilizam as correntes atmosféricas sobre os oceanos, mantendo o voo e ganhando altura com o mínimo esforço físico. Possuem bico forte, curvado, e com um gancho na porção

distal. Alimentam-se de cefalópodes e crustáceos que se aproximam da superfície d'água. São aves exclusivamente marinhas que buscam a terra apenas para nidificar (SICK, 2001).

1.1.2.1.1 *Thalassarche chlororhynchos* (GMELIN, 1789)

O albatroz de nariz amarelo, *Thalassarche chlororhynchos*, (Figura 1.3) é o menor representante do gênero, com 79 cm de comprimento e envergadura variando de 190 a 207 cm. Essa ave apresenta uma cauda mais longa em relação ao corpo e o bico de coloração preta com uma faixa amarelo vivo na rinoteca. A reprodução ocorre nas Ilhas de Tristão da Cunha (37° 6' S 12° 17' O) e Ilhas Gough (40° 19' 29" S, 9° 55' 43" O) e ocorre migração durante o ano sobre a região subtropical, ou seja, sobre as águas mais quentes dos oceanos. Há registros de dispersão da espécie nos oceanos Atlântico Sul, Índico e Pacífico, até a Nova Zelândia. No Brasil, comumente são visualizados se alimentando sobre a plataforma continental do estado do Rio Grande do Sul até o Rio de Janeiro (Figura 1.4), havendo, ainda, vários registros no nordeste (TICKELL, 2000; SICK, 2001; NEVES, 2006).

Figura 1.3-*Thalassarche chlororhynchos* (albatroz de nariz amarelo)-[S.I.]-2006



Atualmente, a espécie é considerada em perigo de extinção pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2014) e vulnerável segundo o Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção (OLMOS, 2008), uma vez que os censos demográficos nas colônias reprodutivas apontam uma queda de 58% no número de indivíduos nos últimos 70 anos (NEVES, 2006).

Figura 1.4-Locais de visualização do albatroz de nariz amarelo, *Thalassarche chlororhynchus*, ao longo da costa brasileira a partir de observadores a bordo de navios de pesca de espinhel. Dados do Projeto Albatroz-[S.I.]-2006



Fonte: (NEVES, T., 2006)

1.1.2.2 Família Procellariidae

Comumente chamados de tubinares, essas aves apresentam as narinas tubulosas e juntas desde a base dorsal do bico, por onde secretam o cloreto de sódio advindo da glândula de sal. Voam rapidamente rente à superfície do mar, planando e batendo rapidamente as asas e, por apresentarem menor porte se comparados aos albatrozes, conseguem fazer curvas abruptas virando o corpo de um lado para o outro. Também aproveitam a ação das correntes

aéreas horizontais sobre o mar para se deslocar por grandes distâncias. A maioria das espécies dessa Família é visualizada sobre a área da plataforma continental, onde a alimentação é mais rica devido à menor profundidade; alimentam-se de cardumes de peixes jovens e são facilmente atraídos por barcos pesqueiros (SICK, 2001).

1.1.2.2.1 *Macronectes giganteus* (GMELIN, 1789)

Popularmente chamado de pardela, petrel gigante ou urubu do mar, o *Macronectes giganteus* apresenta polimorfismo na coloração de sua plumagem, adquirindo uma cor mais pálida à medida que envelhece. A maioria dos indivíduos observados e reabilitados no território brasileiro é jovem e apresenta coloração marrom ou ferrugem (Figura 1.5). Os machos, apresentando envergadura que varia de 207 a 244cm, são maiores que as fêmeas, com envergadura de 180 a 183cm, e chegam a pesar até 5 quilos (NEVES, 2006). Com hábito alimentar necrófago, consomem preferencialmente carcaças de mamíferos e aves, sendo os pinguins uma importante fonte alimentar durante a época reprodutiva (NEVES, 2006).

Figura 1.5-*Macronectes giganteus* (pardela gigante do sul)-Rio Grande, RS-2010



Fonte: (NIEMEYER, C., 2010)

No Oceano Atlântico essas aves nidificam nas ilhas Falkland (Malvinas) ($51^{\circ} 45' S$, $59^{\circ} 00' W$), na Isla de Los Pájaros (Argentina) ($42^{\circ} 25' 13.29'' S$, $64^{\circ} 30' 31'' W$), nas Ilhas Geórgias do Sul ($54^{\circ} 30' S$, $37^{\circ} 00' O$), nas Ilhas Órcades do Sul ($60^{\circ} 50' S$, $44^{\circ} 25' O$), nas Ilhas Shetland do Sul ($62^{\circ} S$, $58^{\circ} W$), na Ilha Gough ($40^{\circ} 19' 29'' S$, $9^{\circ} 55' 43''$) e em várias outras ilhas próximas à península antártica. A maturidade sexual ocorre por volta dos 6 anos e a expectativa de vida ultrapassa 40 anos (NEVES, 2006). Os maiores deslocamentos migratórios são realizados por aves jovens, que chegam a realizar deslocamentos circumpolares. Também, a maioria dos exemplares recuperados na costa (Figura 1.6) e nos centros de reabilitação brasileiros é composta por juvenis (SICK, 2001; NEVES, 2006). Considerada atualmente vulnerável pela Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2014), a população geral dessas aves apresentou um declínio de 18% nas últimas décadas (NEVES, 2006).

Figura 1.6-Pontos de visualização oceânicos de *Macronectes* spp. (pardela gigante) na costa brasileira a partir de observadores a bordo de navios de pesca de espinhel (dados do Projeto Albatroz)-[S. I.]-2006



Fonte: (NEVES, T., 2006)

1.1.3 Ordem Suliformes - Família Sulidae

Previamente classificados como Pelecaniformes, essas aves apresentam amplas áreas de ocorrência, podendo ser encontradas em todos os oceanos, exceto na região antártica. Os atobás são aves marinhas piscívoras que se alimentam de carapaus, sardinhas, anchovas e outros pequenos peixes oceânicos. Reproduzem-se em colônias mistas juntamente com outras espécies de aves marinhas, como fragatas. As colônias reprodutivas podem-se localizar em ilhas costeiras ou oceânicas isoladas. Apresentam ritual de acasalamento elaborado e os ovos são incubados por 42 a 55 dias. Os ninhegos nascem totalmente dependentes dos progenitores e permanecem no ninho durante 14 a 22 semanas, porém, os cuidados parentais perduram por nove meses, em média. A maturidade sexual e a plumagem adulta são adquiridas entre os 2 e os 6 anos de idade, e a expectativa de vida varia entre 10 e 20 anos (HOWARD, 2003).

1.1.3.1 *Sula leucogaster* (BODDAERT, 1783)

O atobá marrom, *Sula leucogaster*, é a espécie mais comum dos sulídeos na costa brasileira. De coloração marrom escuro, peito posterior e barriga brancos e bico esbranquiçado (Figura 1.7), apresentam dimorfismo sexual na coloração da região peri-oftálmica (pálpebras azuladas nos machos e amareladas nas fêmeas). De maneira geral os machos são menores e mais variados quanto ao colorido, além de apresentarem voz mais fraca (vocalização dentro da colônia). As aves jovens apresentam coloração marrom uniforme (Figura 1.8), com áreas pálidas na região do abdômen e bico cinzento (SICK, 2001; BRANCO, 2004).

Figura 1.7-*Sula leucogaster* (atobá marrom adulto)-Abrolhos, BA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

Geralmente pescam em águas rasas, próximos a praias e rochedos; assim, realizam um mergulho oblíquo e menos profundo. Na costa brasileira nidificam tanto em ilhas oceânicas quanto costeiras, desde os Penedos de São Pedro e São Paulo ($00^{\circ} 55' 02''$ N, $29^{\circ} 20' 44''$ W), no norte do território brasileiro, até as Ilhas Moleques do Sul ($27^{\circ}51' S - 48^{\circ}26' W$), em Santa Catarina (SICK, 2001; BRANCO, 2004). Apesar do declínio populacional geral nos últimos 10 anos, a vasta área de ocorrência da espécie não permite que ela seja considerada vulnerável segundo os critérios da IUCN (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014).

Figura 1.8-*Sula leucogaster* (atobá marrom juvenil)-Abrolhos, BA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

1.1.3.2 *Sula dactylatra* (LESSON, 1831)

O atobá branco, atobá mascarado ou ganso patola de dedos pretos (Figura 1.9) é a maior ave da família *Sulidae* e apresenta vasta distribuição pelos oceanos tropicais e subtropicais (SICK, 2001; BRANCO, 2004). Medindo de 75 a 86cm de comprimento, e apresentando uma envergadura de 150 a 160cm, essas aves mergulhadoras se lançam de uma altura de 20 metros ou mais em queda vertical no mar profundo, atingindo vários metros de profundidade na perseguição de peixes; também se alimentam de peixes voadores próximos a superfície d'água. Com expectativa de vida de 15 a 20 anos, apresentam hábitos mais pelágicos e dificilmente são vistos próximos da costa. No Atlântico Sul nidificam no Arquipélago de Abrolhos (17°25' a 18°09' S e 38°33' a 39°05' O), no Atol das Rocas (3° 51' 50" S 33° 48' 48" O), na Ilha Trindade (20° 31' 29" S 29° 19' 29" O) e no arquipélago de Fernando de Noronha (3° 51' 13.71" S, 32° 25' 25.63" O) (SICK, 2001; BRANCO, 2004). Apesar do declínio populacional global em 30% nos últimos 10 anos devido à presença de espécies invasoras e à perda de hábitat nos sítios reprodutivos, o estado de conservação da espécie continua como pouco preocupante na Lista de Espécies Ameaçadas da IUCN (IUCN, 2014); acredita-se que este declínio não seja suficientemente rápido para alterar o estado da espécie para vulnerável (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2014).

Figura 1.9-*Sula dactylatra* (atobá branco)-Abrolhos-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

1.1.4 Ordem Pelecaniformes; Família Phaethontidae

São aves pelágicas que habitam os mares tropicais e subtropicais e voam de maneira rápida e reta, não sendo perturbados nem por tempestades. Suas retrizes medianas são extremamente alongadas e adelgaçadas do meio para a extremidade, o que lhes confere o nome popular de rabo de palha, e uma aparência distinta entre as aves marinhas. Apresentam bico forte, pontiagudo, com narinas externas e bordos da mandíbula serrilhados. Chegam a mergulhar de alturas consideráveis até três ou quatro metros de profundidade para capturar peixes e polvos. Descansam sobre a água com a cauda levantada e, como a maioria das aves marinhas, boiam com grande facilidade. Em terra decolam com alguma dificuldade e normalmente aterram "de barriga"; não sabem andar direito ou ficar em pé. Reproduzem-se em ilhas oceânicas, em penhascos e em rochedos com buracos, onde põem, sobre a areia ou entre pedras, ovos manchados, ao contrário de outros Pelecaniformes, que têm ovos uniformemente brancos ou azulados. A incubação dura 28 dias e os cuidados parentais com os ninhos duram 63 dias, em média (SICK, 2001, BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2013).

1.1.4.1 *Phaethon aethereus* (LINNAEUS, 1758)

A grazina ou rabo de palha de bico vermelho é considerada uma ave marinha de médio porte (Figura 1.10). Apesar do declínio populacional superior a 30% nos últimos 10 anos, a espécie é considerada não ameaçada segundo os critérios internacionais da IUCN (BIRDLIFE, 2013) devido à sua ampla área de ocorrência mundial. No território brasileiro, essas aves se reproduzem no arquipélago de Abrolhos e no arquipélago de Fernando de Noronha. Em Abrolhos se alimentam majoritariamente de peixes voadores, e a maior quantidade de ninhos está localizada nos rochedos da Ilha de Santa Bárbara (BRANCO, 2004; BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2013).

Figura 1.10-*Phaeton aethereus* (grazina de bico vermelho)-Abrolhos-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

1.2 AGENTES VIRAIS SELECIONADOS

1.2.1 Herpesvírus

Os herpesvírus são constituídos por uma dupla fita de DNA linear, um capsídeo de simetria icosaédrica e um envelope lipídico que apresenta projeções em sua superfície. O tamanho do virion pode variar de 102 a 200 nm quando medido por microscopia eletrônica, e seu genoma relativamente grande, 124-235 Kb, codifica diferentes proteínas internas e externas, que podem ser glicosiladas ou não. Essas proteínas externas da membrana são as responsáveis pelas variações na suscetibilidade dos hospedeiros e pelos diferentes graus de neutralização cruzada. A replicação ocorre no núcleo da célula hospedeira e o envelope é

adquirido quando as partículas virais são liberadas por brotamento através da membrana nuclear (RITCHIE, 1995; KALETA, 2007).

Segundo o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses* - Comitê Internacional de Taxonomia Viral), a taxonomia atual da Ordem Herpesvirales, Família Herpesviridae inclui três subfamílias denominadas Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae e Gammaherpesvirinae (DAVISON, 2010; ICTV, 2013). Todos os herpesvírus isolados de aves domésticas podem ser agrupados na subfamília Alphaherpesvirinae, e diferentes espécies já foram identificadas em mais de 100 espécies de aves silvestres sendo que a imensa maioria destas ainda não foi completamente caracterizada e classificada (KALETA, 2007; DAVISON, 2010).

A inalação de poeiras de penas contendo partículas virais e o contato com secreção nasal, saliva, urina e fezes são as formas predominantes de transmissão do vírus de ave para ave. A transmissão vertical nunca foi comprovada, porém, ninhegos podem ser infectados por meio da ingestão de leite de papo (em Columbiformes e alguns psitacídeos) ou por meio da saliva e secreções presentes no regurgito. Uma vez que o vírus é sensível ao ambiente, vetores não são significativos na transmissão e disseminação desse agente (RITCHIE, 1995; KALETA, 2007).

Os herpesvírus aviários apresentam distribuição mundial e já foram isolados tanto em aves domésticas quanto em aves selvagens de vida livre ou em cativeiro, estando essas enfermas ou aparentemente saudáveis. A infecção por herpesvírus nas aves pode-se manifestar de diferentes formas, e comumente os indivíduos que se recuperam tendem a manter uma infecção latente por tempo prolongado. Em muitos casos, infecções por outros agentes, ou fatores estressantes tais como alterações ambientais, sociais ou estações reprodutivas, podem desencadear formas variáveis da doença e promover epizootias que resultem em mortalidade significativa (KALETA, 2007).

O tempo de incubação do vírus varia de cinco a dez dias e, em casos de surtos naturais, as mortes ocorrem 12 a 14 dias após a introdução do agente na população. A patogenicidade varia de acordo com a espécie viral e a suscetibilidade do hospedeiro, podendo causar lesões hemorrágicas, necrotizantes ou neoplásicas, infectando e apresentando tropismo pelos tecidos linfático, nervoso ou epitelial (RITCHIE, 1995). Hospedeiros adaptados normalmente apresentam uma forma discreta, subclínica e latente de infecção que persiste por toda a vida do animal. Hospedeiros não adaptados comumente apresentam uma forma severa

e letal de infecção, frequentemente associada à morte e à lise das células infectadas, como ocorre na infecção por *Psittacid herpesvirus 1* (doença de Pacheco) e *Anatid herpesvirus 1* (peste dos patos), entre outros (RITCHIE, 1995).

1.2.2 Poxvírus

Os poxvírus são constituídos por uma dupla fita de DNA, um capsídeo centralizado de simetria complexa bicôncava e dois corpos laterais em cada concavidade, e são envolvidos por um envelope (TRIPATHY, 2008). Estão entre os maiores e mais complexos vírus que infectam animais, apresentando formato de tijolo e medindo 150-250 nm X 265-350 nm (VAN RIPER III, 2007). Seu grande genoma, de aproximadamente 300Kb, contém genes que codificam diferentes proteínas internas e essenciais para a replicação viral tais como DNA ligase, DNA uracil glicoligase, DNA polimerase, DNA topoisomerase, entre outras, além de possuírem genes que codificam proteínas reparadoras do DNA viral. Diferentemente da maioria dos DNA vírus, a replicação do poxvírus ocorre no citoplasma da célula hospedeira (VAN RIPER III, 2007; TRIPATHY, 2008).

Em relação à taxonomia da Família Poxviridae, existem duas subfamílias descritas: Entomopoxvirinae e a Chordopoxvirinae, na qual o gênero *Avipox* está inserido. Dentro do gênero *Avipox* existem, até o momento, dez espécies descritas e classificadas, sendo o *fowlpox* e o *canarypox* vírus os mais frequentemente identificados (STANNARD, 1998; BOLTE, 1999; JARMIN, 2006).

A boubá, varíola ou poxvirose aviária, é uma doença comum em aves de produção, pombas e canários. Já foi relatada em mais de 232 espécies dentre as 23 ordens de aves e apresenta distribuição mundial (TRIPATHY, 2008). É uma enfermidade de desenvolvimento lento e a ave portadora pode não apresentar nenhum quadro clínico, servindo de reservatório e disseminando a doença para outros indivíduos da mesma espécie e para outras populações locais. Existem diferentes genótipos de poxvírus aviário; alguns são espécie-específicos e outros são capazes de infectar diferentes espécies aviárias (RITCHIE, 1995; TRIPATHY, 2008).

A transmissão do vírus pode ocorrer tanto pela forma indireta quanto pela forma direta. Tripathy et al. (2008) descrevem que mais de 11 espécies de mosquitos da Ordem Diptera já foram identificadas como vetores do poxvírus aviário, além de carrapatos e pulgas (KANE, 2012). Os poxvírus são extremamente resistentes, mesmo fora do organismo hospedeiro, sendo a suscetibilidade aos agentes químicos e físicos um dos fatores de classificação taxonômica entre as espécies. Contudo, o virion não é capaz de atravessar a pele íntegra; assim a transmissão direta ocorre quando a mucosa ou a pele lesionada entra em contato com qualquer secreção ou sujidade que contenha partículas virais (VAN RIPER III, 2007; TRIPATHY, 2008).

A infecção pode se manifestar de diferentes formas e, segundo Ritchie et al. (1995), a via de infecção pode ser o fator determinante. A forma cutânea manifesta-se quando o vírus adentrasse o organismo hospedeiro via picada de mosquito ou através da pele lesionada; já a forma diftérica se manifestaria quando as partículas virais fossem inaladas ou ingeridas. A forma cutânea se caracteriza pela presença de lesões verrucosas, ulceradas ou não, que ocorrem geralmente em regiões aptéricas, ou seja, regiões sem a presença de penas, tais como a comissura do bico, as pálpebras e os membros posteriores. Essas lesões podem ainda ser infectadas por bactérias, gerando quadros secundários que podem agravar a situação clínica da ave. A ave pode também apresentar prostração e caquexia caso as lesões dificultem a ingestão de alimentos (RITCHIE, 1995; TRIPATHY, 2008).

A forma diftérica se mostra com lesões necróticas úmidas localizadas na mucosa oral, na porção superior do trato gastrointestinal e no sistema respiratório. Essa forma leva a grande morbidade e mortalidade por dificultar, e muitas vezes impedir, a deglutição de alimentos, a absorção de nutrientes e a respiração. A forma generalizada se caracteriza pela replicação inicial do vírus nas células epiteliais, seguida de viremia primária para o fígado, baço e medula óssea. Nesses locais o vírus se replica novamente e uma segunda viremia acaba por disseminar o vírus por todo o organismo, causando lesões generalizadas e morte súbita (RITCHIE, 1995; REVOLLEDO, 2009).

1.2.3 Coronavírus

Os coronavírus são constituídos por uma fita simples positiva de RNA linear, recoberta por uma proteína N (nucleoproteína interna) e glicoproteínas de membrana (M) formando um vírus de formato circular a pleomórfico cujo envelope mede aproximadamente 120nm de diâmetro e é recoberto por espículas de 20nm de comprimento. Seu genoma, 27,6 Kb, codifica basicamente essas três proteínas estruturais: M, N e S (espículas). A glicoproteína S é responsável pela adesão viral e apresenta dois glicopolipeptídeos, S1 e S2. A maioria dos anticorpos de neutralização viral são induzidos por epítomos de S1. A replicação ocorre no citoplasma da célula hospedeira e os virions são montados em membranas internas da célula como, por exemplo, na membrana do complexo de Golgi, e não na superfície celular (CAVANAGH, 2008).

Os coronavírus pertencem a Ordem *Nidovirales*, Família *Coronaviridae*, dividida em quatro gêneros: *Alphacoronavirus* e *Betacoronavirus*, geralmente identificados em mamíferos; e *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*, principalmente identificados nas aves (CAVANAGH, 2008; CHU, 2011; ICTV, 2013). A maioria dos coronavírus identificados em aves aquáticas pode ser agrupada no gênero *Deltacoronavirus* (CHU, 2011).

A transmissão ocorre por inalação ou contato direto com partículas virais. A transmissão vertical nunca foi comprovada, porém o vírus pode permanecer viável na casca do ovo e infectar o embrião após a eclosão. Em aves comerciais a infecção por coronavírus é denominada bronquite infecciosa, caracterizada como uma enfermidade altamente contagiosa, aguda e de grande importância econômica devido aos impactos que gera na produção mundial de frangos e ovos (CAVANAGH, 2008).

O vírus apresenta alta taxa de mutação e recombinação, o que dificulta o controle da doença e facilita a emergência de novas cepas virais (CAVANAGH, 2008; LIAIS, 2014). A infecção se inicia geralmente nas vias respiratórias, independentemente do tropismo viral e, após a primeira replicação, infecta células epiteliais de diferentes tecidos tais como o respiratório, o renal, o reprodutor, o digestório e o imunológico, podendo ou não causar lesões. O período de incubação do vírus é muito curto, de 18 a 36 horas e, dependendo da mutação gênica viral e da suscetibilidade do hospedeiro, pode causar doença fulminante com alto índice de mortalidade (LIAIS, 2014).

2 OBJETIVO

O presente estudo objetivou identificar a ocorrência de agentes virais selecionados, herpesvírus, poxvírus e coronavírus, que possam estar envolvidos na mortalidade ou morbidade das aves marinhas de vida livre e em centros de reabilitação no litoral brasileiro, desde o arquipélago de Abrolhos, no estado da Bahia, até o município de Rio Grande, no estado do Rio Grande do Sul, e em quatro colônias reprodutivas de pinguins de Magalhães na Patagônia argentina.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Pesquisar a ocorrência de *Poxvirus* nas populações de pinguins de Magalhães dos centros de reabilitação associados ao projeto, com uso de PCR e sequenciamento;
- Pesquisar a ocorrência de *Coronavirus* aviário nas populações de *Spheniscidae*, *Sulidae* e *Procellaridae* dos centros de reabilitação associados ao projeto, com uso de PCR e sequenciamento;
- Pesquisar a ocorrência de *Herpesvirus* nas populações *Sulidae* e *Phaetontidae* de vida livre que se reproduzem no Brasil, dos *Spheniscidae* nas colônias da Patagônia argentina e de todas as aves dos centros de reabilitação associados ao projeto, com uso de PCR e sequenciamento;
- Correlacionar e descrever possíveis alterações clínicas e histopatológicas em aves positivas para as enfermidades verificadas com a realização de necropsia e exames histopatológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

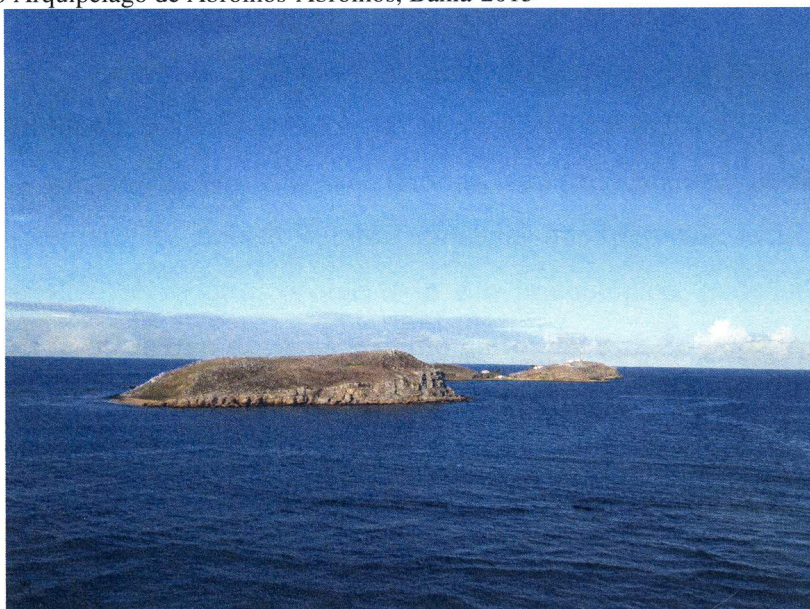
3.1 COLETA DE AMOSTRAS

Foram colhidas amostras de aves marinhas de diferentes espécies procedentes das colônias reprodutivas localizadas no arquipélago de Abrolhos e na Patagônia argentina e nos Centros de Reabilitação de Animais Selvagens parceiros ao projeto: Centro de Recuperação de Animais Marinhos (CRAM-RS), R3 ANIMAL-SC e Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM-ES). As amostras foram colhidas e transportadas de acordo com a autorização ICMBio/SISBio protocolo nº 36250-5 e aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), protocolo nº 8819081014. A tabela 1.1 sumariza os sítios de colheita, as espécies amostradas e o número de amostras/espécie/sítio.

3.1.1 Arquipélago dos Abrolhos, Bahia

O arquipélago dos Abrolhos (Figura 3.1) é constituído por cinco ilhas: Santa Bárbara, Redonda, Siriba, Sueste e Guarita.

Figura 3.1-Ilhas do Arquipélago de Abrolhos-Abrolhos, Bahia-2013



Localizado a 35 milhas náuticas da costa sul do estado da Bahia (17°25' a 18°09' S e 38°33' a 39°05' O) (Figura 3.2), parte do arquipélago foi transformada no primeiro Parque Nacional Marinho do Brasil em 1983 (BRANCO, 2004). Parques Nacionais Marinhos são Unidades de Conservação de proteção integral, voltados à preservação da biodiversidade e recuperação dos recursos pesqueiros, onde apenas atividades de turismo e pesquisa são permitidas. O Parque Marinho dos Abrolhos conserva porções dos recifes de corais da região e das correspondentes formas de vida a eles associadas. Devido a sua importância, foi declarado Posto Avançado da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica e recebeu em 2009 título Ramsar, ou seja, adentrou na lista de zonas úmidas de importância internacional (Convenção de Ramsar), concedido às áreas marinhas de importância internacional (CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL BRASIL, 2003).

Figura 3.2-Mapa geográfico com a localização dos Parques Nacionais e Unidades de Conservação no sul do estado da Bahia

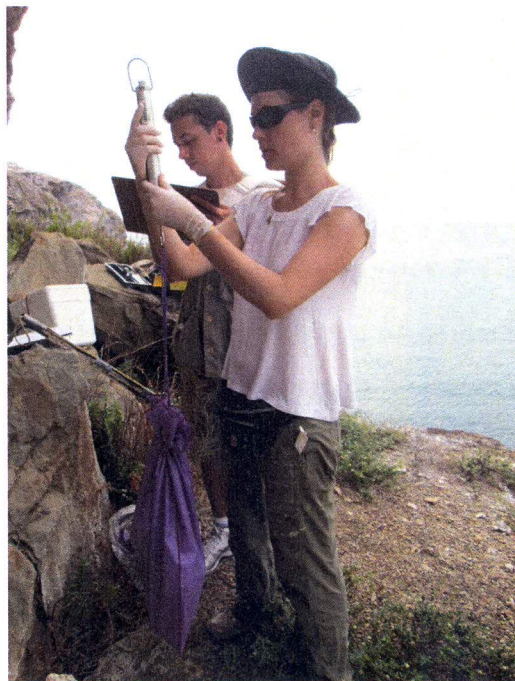


Fonte: (www.conservation.org, 2013)

A expedição de colheita de material foi realizada em março de 2013 em parceria com a Avidepa (Associação Vila-velhense de Proteção Ambiental) e com o ICMBio, instituições que realizam o monitoramento reprodutivo da avifauna local há mais de 10 anos.

Foram colhidas amostras de *S. leucogaster*, *S. dactylatra*, *P. aethereus* e *P. lepturus*. As aves foram capturadas no ninho com as mãos ou com puçá, pesadas (Figura 3.3), e um volume sanguíneo relativo a 1% do peso total foi retirado a partir da punção da veia társica (Figura 3.4). Foi colhido um *swab* traqueal (Figura 3.5) e dois *swabs* cloacais (Figura 3.6) para subsequente análise virológica. As aves foram então anilhadas e soltas (Figura 3.7).

Figura 3.3-Exemplar de *Phaeton aethereus* (grazina de bico vermelho) sendo pesada com uso de dinamômetro e saco de TNT (Tecido Não Tecido) Abrolhos, BA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

Figura 3.4-Colheita de sangue pela punção da veia ulnar medial de uma *Sula dactylatra* (atobá branco) Abrolhos, BA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

Figura 3.5-Colheita de *swab* traqueal de um exemplar de *Sula dactylatra* (atobá branco)-Abrolhos, BA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

Figura 3.6-Colheita de *swab* cloacal de um exemplar de *Sula dactylatra* (atobá branco)-Abrolhos, BA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

Figura 3.7-Soltura de um exemplar de *Phaeton aethereus* (grazina de bico vermelho) após colheita de amostras biológicas–Abrolhos, BA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

3.1.2 Colônias reprodutivas na Patagônia argentina

Foram realizadas duas expedições, em janeiro de 2012 e em janeiro de 2014, para colheita de amostras de pinguins de Magalhães, *Spheniscus magellanicus*, nas colônias reprodutivas da província de Chubut, localizada na Patagônia argentina (Figura 3.8). As expedições foram executadas com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2010/51801-5), e em parceria com a Sociedade para

Conservação da Vida Livre (Wildlife Conservation Society, WCS) e com a Universidade da Califórnia (University of California - Davis), sob a coordenação da médica veterinária Marcela Uhart, uma vez que a WCS realiza um programa de monitoramento de doenças nos pinguins da Patagônia há mais de 10 anos.

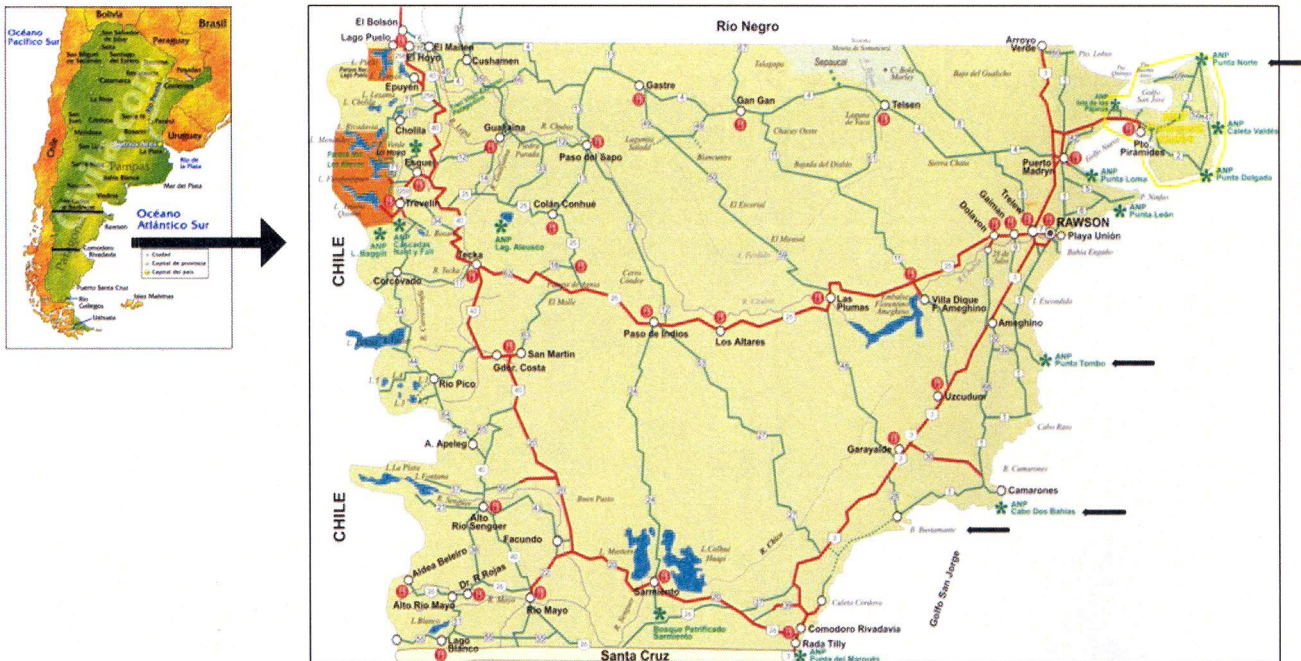
Foram colhidas amostras de 30 aves adultas e 10 ninhegos de cada uma das seguintes colônias reprodutivas: Estância La Ernestina (Península Valdez) ($35^{\circ} 43' S$; $61^{\circ} 27' O$), Punta Tombo ($44^{\circ} 04' S$; $65^{\circ} 11' O$), Cabo Dos Bahías ($44^{\circ} 55' S$; $65^{\circ} 33' O$) e Bahía Bustamante ($45^{\circ} 08' S$; $66^{\circ} 32' O$) (Figura 3.9).

Figura 3.8-Colônias reprodutiva de *S. magellanicus* na Patagônia argentina.-Cabo Dos Bahías, Chubut-2014



Fonte: (NIEMEYER, C., 2014)

Figura 3.9-Localização geográfica das colônias reprodutivas (assinaladas com as setas) amostradas na Província de Chubut-Argentina-2014



Fonte: (NIEMEYER, C. 2014) adaptado de (<<http://www.lupacorp.com>>, 2008)

Em todas as amostragens foram realizados registros individuais e detalhados, tais como: data da colheita, local de captura, grupo etário (Figura 3.10), etc. A coleta de material biológico foi realizada por meio da contenção física pelo tempo máximo de cinco minutos por animal para evitar o estresse demasiado dos animais em estado reprodutivo e o possível abandono do ninho. Durante a contenção foi realizado o exame físico rápido, seguido da colheita de sangue pela punção da veia jugular (Figura 3.11), da coleta de *swabs* orais e cloacais e da pesagem das aves (Figura 3.12). Os *swabs* colhidos para análise virológica foram armazenados em nitrogênio líquido e processados posteriormente no Laboratório de Virologia do Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), parceiro do projeto, localizado na província de Buenos Aires, sob a supervisão do Doutor Ariel Pereda.

Figura 3.10-Ninhego de *Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães)-Bahía Bustamante, Chubut-2012



Fonte: (NIEMEYER, C., 2012)

Figura 3.11-Punção da veia jugular de um exemplar de *Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães)-Bahía Bustamante, Chubut-2012



Fonte: (NIEMEYER, C., 2012)

Figura 3.12-Pesagem de *Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães)-Bahía Bustamante, Chubut-2012



Fonte: (NIEMEYER, C., 2012)

3.1.3 Centros de reabilitação

Ao total, 275 amostras de aves marinhas em processo de reabilitação foram analisadas neste projeto, cedidas pelas seguintes instituições parceiras: Centro de Recuperação de Animais Marinhos do Museu Oceanográfico Prof. Eliézer de Carvalho Rios, da Fundação Universidade Federal do Rio Grande (CRAM, Rio Grande, RS), R3 Animal e Centro de Triagem de Animais Silvestres do Núcleo de Fauna de Florianópolis (CETAS-FLO, Florianópolis, SC) e Instituto de Pesquisa e Reabilitação de Animais Marinhos (IPRAM, Vitória, ES).

Esses centros, localizados em três diferentes estados brasileiros (Figura 3.13), recebem animais marinhos nascidos em vida livre que, por diferentes razões, associadas à ocorrência de manchas de petróleo na costa brasileira ou não, são resgatados nas praias em condições de saúde diversas. Para o monitoramento das enfermidades virais selecionadas, buscou-se colher

amostras de *swabs* traqueais e cloacais assim que a ave fosse resgatada e adentrasse o centro, e novamente antes que retornasse à vida livre.

Nos casos de óbito ao longo do processo de reabilitação, os animais foram necropsiados e os órgãos foram colhidos e armazenados em formol 10% para as análises histopatológicas. Ao mesmo tempo, amostras de aproximadamente um grama de rim, fígado, bursa, pulmão, cérebro, traqueia e baço foram colhidas e congeladas a -20°C .

Figura 3.13-Localização geográfica dos centros de reabilitação que forneceram amostras de aves marinhas para este Projeto-São Paulo-2014



Fonte: (www.brasil-turismo.com adaptado por NIEMEYER, C., 2014)

Tabela 1.1 - Espécies de aves marinhas de vida livre e em processo de reabilitação amostradas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul ao longo da costa brasileira e nas colônias reprodutivas da Patagônia argentina no período de julho de 2011 a janeiro de 2014

NOME CIENTÍFICO	NOME POPULAR	LOCAL DE AMOSTRAGEM	DATA	GRUPO ETÁRIO	NÚMERO
<i>Sula dactylatra</i>	Atobá Branco	Santa Bárbara-Abrolhos, BA	Março/2013	Adulto	23
<i>Sula leucogaster</i>	Atobá marrom	Santa Bárbara-Abrolhos, BA	Março/2013	Adulto	20
<i>Phaeton aethereus</i>	Grazina de bico vermelho	Santa Bárbara-Abrolhos, BA	Março/2013	Adulto	29
<i>Phaeton lepturus</i>	Grazina de bico laranja	Santa Bárbara-Abrolhos, BA	Março/2013	Adulto	4
<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães	Patagônia - Argentina	Janeiro/2014	Adultos	144
<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães	Patagônia - Argentina	Janeiro/2014	Ninho	31
<i>Macronectes giganteus</i>	Petrel gigante	CRAM-Rio Grande, RS	Agosto/2011	Adulto	2
<i>Thalassarche chlororhynchos</i>	Albatroz de nariz amarelo	CRAM-Rio Grande, RS	Abril/2013	Adulto	12
<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de magalhães	CRAM-Rio Grande, RS	2011	Juvenil/Adulto	107
<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de magalhães	IPRAM-Vitória, ES	2012	Juvenil/Adulto	55
<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de magalhães	R3-Florianópolis, SC	2012	Juvenil/Adulto	99
<i>Sula leucogaster</i>	Atobá marrom	R3 - Florianópolis, SC	Agosto/2012	Adulto	4
Total					530

Vida livre

Em reabilitação

3.2 ARMAZENAMENTO E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.2.1 No Brasil

Os *swabs* colhidos, tanto de traqueia quanto de cloaca, foram armazenados separadamente em microtubos secos, previamente identificados com o número do animal, espécie e local de amostragem, e foram mantidos a -20°C até chegarem ao Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens (LAPCOM) localizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, onde foram mantidos a -80°C até o processamento.

Uma alíquota de aproximadamente um grama dos órgãos internos (pulmões, traqueia, rim e baço) das aves necropsiadas nos centros de reabilitação foi colhida e armazenada em microtubos e mantidos a -20°C , nas instituições, até serem enviados para o LAPCOM. As amostras de rim, traqueia e pulmão foram maceradas em microtubos, com auxílio de tesouras e pinças. Em cada microtubo esterilizado e livre de nucleases, foi preparada uma suspensão da amostra a 50% (volume/volume) em água DEPC e homogenizou-se em vórtex. Em seguida, os tubos foram submetidos a 3 ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 56°C , e clarificadas a 5000g durante 15 minutos a 4°C , tomando-se o sobrenadante como amostra, que foi armazenada a -80°C até o processamento.

3.2.2 Na Argentina

Os *swabs* colhidos, tanto de traqueia quanto de cloaca, foram armazenados em microtubos secos, previamente identificados com o número do animal, espécie e local de amostragem, e foram mantidos em nitrogênio líquido até chegarem ao Instituto de Virologia junto ao Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuária (INTA), localizado na província de Buenos Aires. Lá as amostras foram mantidas a -80°C até o processamento sob a supervisão do Professor Doutor Ariel Pereda.

As 144 amostras de *swabs* de pinguins adultos e as 31 amostras de ninhegos foram reunidas em *pools* respeitando os critérios de idade, origem da amostra (traqueia ou cloaca) e colônia coletada. Cada *pool* continha amostras de 3 a 5 animais. Ao total foram realizados 9 *pools* de amostras da colônia La Ernestina, 10 *pools* de Punta Tombo, 10 *pools* de Cabo dos Baías e 9 de Bustamante.

Os *swabs* foram colocados em um tubo grande e eluídos com 1 ml de solução tampão fosfato-salino (PBS) adicionado de 100 μ g/ml de ampicilina. Os tubos foram homogeneizados com auxílio de um vórtex e depois centrifugados por 10 minutos a 8000 g para separação das fases. 400 μ l do sobrenadante foram retirados e colocados em outro microtubo para que fosse realizada a extração do DNA.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

3.3.1 No Brasil

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo Brandão. A extração do DNA total das amostras foi realizada com uma alíquota de 100 μ l do sobrenadante da amostra, adicionada a 500 μ l de solução de lise (SDS 1%; 100mM EDTA pH 8.0; 20mM Tris-HCL pH 8.0; água Milli-Q) contendo 10 μ L de Proteinase K. A solução foi incubada *overnight* na bancada. Para os *swabs*, a extração de DNA foi realizada diretamente sem a eluição prévia da amostra, emergindo-os diretamente na solução de lise. Após o primeiro passo, foram adicionados 250 μ L de fenol e 250 μ L de clorofórmio aos microtubos, que foram então homogeneizados com auxílio de um vórtex, e depois centrifugados por 10 minutos a 12000 g e a 4° C para separação das fases. O sobrenadante foi retirado e colocado em outro microtubo com a mesma proporção de propanol; essa solução permaneceu a -20° C por duas horas e posteriormente foi centrifugada por 25 minutos a 12000 g a 4° C para a precipitação do pellet. A purificação do pellet foi feita por inversão e lavagem com etanol 70%. O material extraído foi eluído em 30 μ l de TE pH 8,0 (10mM TRIS HCl; 1mM EDTA) e armazenado a -80°C para as etapas

posteriores. Para cada 6 amostras extraídas, foi utilizado um controle negativo (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA).

3.3.2 Na Argentina

O DNA foi extraído com o uso de QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen© Hilden, Alemanha) conforme as indicações do fabricante e aliqotado em 3 tubos para armazenamento a -80°C.

3.4 EXTRAÇÃO DE RNA E RT-PCR

Os procedimentos descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular e Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal, FMVZ-USP, sob a supervisão do Prof. Dr. Paulo Brandão. A extração do RNA total das amostras para a pesquisa de *Coronavirus*, tanto do controle positivo (vacina NOBILIS® H120, MSD São Paulo, Brasil) quanto do controle negativo (água DEPC), foi realizada com TRIzol Reagent (Invitrogen®, EUA), conforme as instruções do fabricante, e armazenado a -80°C para as etapas posteriores. Para os *swabs*, a extração de RNA foi realizada diretamente sem a eluição prévia das amostras. Para cada 5 amostras extraídas foi utilizado um controle negativo (água DEPEC autoclavada e livre de RNase).

A transcrição reversa foi realizada a partir de 3,5 µL do RNA extraído e desnaturado (a 95°C, por 5 minutos) utilizando-se M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen®, EUA), conforme instruções do fabricante, em volume final de 10 µL, utilizando-se Random primers (Invitrogen®, EUA).

3.5 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As amostras de tecido (pulmão e traqueia) e os *swabs* traqueais foram testados para herpesvírus; as amostras de rim e os *swabs* cloacais para coronavírus; e as amostras de

pulmão, lesão de pele e *swabs* cloacais para poxvírus aviário, todos segundo os protocolos descritos a seguir. As informações dos *primers* utilizados no presente trabalho constam no quadro 1.

3.5.1 Herpesvírus

Para pesquisa de herpesvírus, cada amostra de DNA foi testada por nested-PCR utilizando-se inicialmente um par de *primers* externos (GE1S e GE2AS), que amplificam um fragmento de 540 pb, seguido de um par de *primers* internos (GE3S e GE4AS), cujo produto final possui 219 pb de uma região conservada da glicoproteína E do genoma dos herpesvírus aviários causadores da LTI (Laringotraqueíte Infecciosa) (CHACON, 2008).

Posteriormente, o método foi modificado para o protocolo descrito por VanDevanter et al. (1996), que elaboraram um conjunto de 5 *primers* capazes de se hibridizar as regiões conservadas de diferentes subfamílias de herpesvírus. Assim, as amostras de DNA foram novamente testadas numa segunda nested-PCR utilizando-se um trio de *primers* iniciais (DFA, ILK e KG1) que amplificam um fragmento de 800 pb, seguida de nested com *primers* internos (TGV e IYG), cujo produto final possui de 215 a 315 pb do gene que codifica uma região conservada da DNA polimerase viral.

Para cada reação foram utilizados controles negativos (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA) e positivos (amostra internada sequenciada e clonada). A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200 µl adicionando 2,5µl de DNA extraído acrescido de 22,5 µl de Mix [12,625 µl de água de Milli-Q; 2,5 µl de Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen® Carlsbad, CA); 4,0 µl de dNTP (Invitrogen® Carlsbad, CA); 1,25 µl de cada primer; 0,75 µl de Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen® Carlsbad, CA); e 0,125 µl de Taq polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA)], para um volume total de 25 µl de solução. As condições de temperatura da PCR, realizada no termociclador Biotron Trio (Biometra® New Jersey, USA), para amplificação de um fragmento do gene da DNA polimerase eram: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguidos por 45 ciclos de 30 segundos a 94°C, 60 segundos a 46°C, 60 segundos a 72°C, e 7 minutos a 72°C. Para o gene da glicoproteína E: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguidos por 45 ciclos de 60 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C, 45 segundos a 72°C, com extensão final por 10 minutos a 72°C.

3.5.2 Coronavírus

Para pesquisa de coronavírus, cada amostra de c-DNA foi testada por hemi nested-PCR, utilizando-se inicialmente um par de *primers* externos (UTR41S e UTR11A), que amplificam um fragmento de 266 pb, seguindo na hemi nested de um *primer* interno (UTR31A) juntamente com o *primer* UTR41S da PCR para o produto final de 179 pb de uma região muito conservada e não codificante do genoma dos coronavírus aviários (CAVANAGH, 2002).

Para cada reação foram utilizados controles negativos (água DEPEC autoclavada e livre de RNase) e positivos (vacina NOBILIS® H120, MSD São Paulo, Brasil). A reação de amplificação foi realizada em microtubos de 200 µl adicionando 2,5µl de c-DNA acrescido de 22,5 µl de Mix [12,625 µl de água de Milli-Q; 2,5 µl de Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen® Carlsbad, CA); 4,0 µl de dNTP (Invitrogen® Carlsbad, CA); 1,25 µl de cada primer; 0,75 µl de Cloreto de Magnésio (50 mM, Invitrogen® Carlsbad, CA); e 0,125 µl de Taq polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA)], para um volume total de 25 µl de solução. As condições de temperatura da PCR, realizada no termociclador Biotron Trio (Biometra® New Jersey, USA), para a região 3UTR do genoma foram: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguidos por 34 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 48°C, 60 segundos a 72°C, e 10 minutos a 72°C.

3.5.3 Poxvírus

Para pesquisa de poxvírus, cada amostra de DNA foi testada por PCR utilizando-se um par de *primers* (P1S e P1A), que amplificam um fragmento de 579 pb do gene codificador da proteína P4b do capsídio viral (LEE, 1997). As amostras positivas para este gene foram testadas por um segundo PCR utilizando-se um par de *primers* (H3LS e H3LA) que amplificam um fragmento de 892 pb do gene 140, conforme descrito a seguir (CARULEI, 2009).

Para cada reação foram utilizados controles negativos (água Milli-Q autoclavada e livre de DNA) e positivos (vacina Diftovax® Merial, Paulinia, Brasil). A reação de

amplificação foi realizada em microtubos de 200 μ l, adicionando 2,5 μ l de DNA extraído acrescido de 22,5 μ l de Mix [12,625 μ l de água de Milli-Q; 2,5 μ l de Buffer (200 mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen® Carlsbad, CA); 4,0 μ l de dNTP (Invitrogen® Carlsbad, CA); 1,25 μ l de cada primer; 0,75 μ l de cloreto de magnésio (50 mM, Invitrogen® Carlsbad, CA); e 0,125 μ l de Taq polimerase (Invitrogen® Carlsbad, CA)], para um volume total de 25 μ l de solução. As condições de temperatura da PCR, realizada no termociclador Biotron Trio (Biometra® New Jersey, USA), para o gene da proteína P4b eram: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguidos por 32 ciclos de 60 segundos a 94°C, 60 segundos a 60°C, 60 segundos a 72°C, e 7 minutos a 72°C. Para o gene 140: 1 ciclo a 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 55°C, 60 segundos a 72°C, com extensão final por 10 minutos a 72°C.

3.6 LEITURA E ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal (5 μ L DNA amplificado acrescido de 2 μ l de corante Gel Loading Buffer (Invitrogen® Carlsbad, CA) em gel de agarose 1,5% (1,5 mg de Agarose Ultra-Pure Invitrogen® Carlsbad, CA; 100 mL TBE 0,5X [44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA]) acrescido de tampão de corrida TBE 0,5X pH 8,0 à 110V/50mA. O gel foi corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/mL e visualizado com luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphalmager®). As amostras que revelavam bandas de DNA na altura do controle positivo, confirmando a amplificação de nucleotídeos, eram consideradas positivas para a reação da PCR utilizada.

3.7 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE NUCLEOTÍDEOS

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), que consiste em Exonuclease I (Exo I) para digerir excesso de *primers* e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Em microtubos de 500 μ L, previamente identificados, foram adicionados 4 μ L de ExoSAP e 10 μ L da amostra amplificada na PCR; em seguida as

amostras foram colocadas no termociclador durante 30 minutos (15 minutos a 37°C e 15 minutos a 80°C). Após a purificação, os nucleotídeos foram submetidos ao sequenciamento utilizando o Kit comercial BigDye® Terminator v 3.1 (Applied Biosystems/Austin, TX) de acordo com especificações do fabricante, sendo 5 µL de DNA purificado (concentração máxima de 100 ng), 2 µL de “Big Dye”, 0,5 µL de oligonucleotídeos iniciadores específicos senso e anti-senso (5 pmoles/µL) e 1,5 µL de *buffer*. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, modelo ABI Prism 310 Genetic, FosterCity, CA) disponível no Laboratório de Biologia Molecular Aplicado a Sorologia (LABMAS), do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

3.8 ANÁLISES DAS SEQUÊNCIAS

As sequências obtidas foram submetidas à análise qualitativa do eletroferograma pelo programa PHRED (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph>), e apenas aquelas com valores superiores a 20 foram aceitas e alinhadas formando um *contig* para cada amostra. Os *contigs* foram submetidos à análise de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST two sequences analysis) (ALTSCHUL, 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank.

3.9 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As sequências obtidas para os diferentes grupos virais e genes foram alinhadas com diversas sequências disponíveis no GeneBank. A árvore filogenética foi elaborada com o programa MEGA v.6.0 (TAMURA, 2011) utilizando-se o método de inferência filogenética *neighbor-joining*, o modelo de substituição de aminoácidos de Poisson, testando-se a confiabilidade dos ramos pelo método *bootstrap* com valores de 1000 repetições.

Quadro 1 - Lista dos *primers* utilizados nas Reações em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de patógenos

Gene/Primers	Especificidade	Sequencias dos <i>primers</i> (5' - 3')	Fragmento Amplificado	Referências
Glicoproteína E	<i>Herpesvirus</i>			
GE1S		CGTATACCATCCTACAGACGGCA	540	Chacon et al, 2008
GE2AS		CGTACAATGGTTCGGTCTTGGA		
GE3S		AGTCCTCTTATAGCCATCCCCA	219	
GE4AS		CACCCCCGCGACGACGAAGT		
DNA Polimerase	<i>Herpesvirus</i>			
DFA		GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC	800	VanDevanter et al, 1996
ILK		TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA		
KG1		GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT		
TGV		TGTAATCTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNG T	215 - 315	
IYG		CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT		
3'UTR	<i>Coronavirus</i>			
UTR 41S		ATGTCTATCGCCAGGGAAATGTC	266	Cavanagh et al, 2002
UTR 11A		GCTCTAACTCTATACTAGCCTA		
UTR 31A		GGGCGTCCAAGTGCTGTACCC	179	
P4b	<i>Poxvirus</i>			
P1S		CAGCAGGTGCTAAACAACAA	578	Lee & Lee, 1997
P1A		CGGTAGCTTAACGCCGAATA		
H3L	<i>Poxvirus</i>			
S140		GAAGTAGAGTTATCGGTTC	890	Carulei et al, 2009
A140		GGTGATCCATTTCATTTC		

4 UM NOVO HERPESVÍRUS ASSOCIADO À LARINGOTRAQUEÍTE EM PINGUINS DE MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*) NO SUL DO BRASIL

4.1 INTRODUÇÃO

A infecção por herpesvírus já foi identificada em várias espécies de mamíferos, aves, répteis e peixes. (RITCHIE, 1995; DAVISON, 2010). Nas aves, os herpesvírus podem causar diferentes enfermidades e sinais clínicos dependendo da espécie viral e da susceptibilidade do hospedeiro. Dentre as enfermidades, causadas por herpesvírus em aves, destacam-se a doença de Pacheco, causada pelo *Psittacid herpesvirus 1* (PsHV-1), que pode ocasionar morte súbita devido a necrose celular, e que tem como células alvo os hepatócitos e linfócitos; a doença de Marek, causada pelo *Gallid herpesvirus 2* (GaHV-2), que causa neoplasma em tecidos linfoides como timo e bursa e tecido nervoso periférico; e o vírus da laringotraqueíte, *Gallid herpesvirus 1* (GaHV-1), causador de doença respiratória aguda com dispneia, insuficiência respiratória e produção de exsudato sanguinolento, tendo como alvo o epitélio respiratório em geral (RITCHIE, 1995; THUREEN, 2006).

A primeira suspeita de infecção por herpesvírus em pinguins foi descrita por Kincaid et al. (1988) nos pinguins africanos (*Spheniscus demersus*) no Zoológico de Baltimore, EUA. Naquele caso, os animais apresentaram prostração e insuficiência respiratória e as lesões histopatológicas consistiam em infiltrado inflamatório com formação de células sinciciais e corpúsculos de inclusão intranucleares tipo A nas células epiteliais dos sinos, traqueia e brônquios. Apesar do agente não ter sido molecularmente caracterizado, o vírus foi classificado posteriormente como *Spheniscid herpesvirus 1* (SpHV1) baseado no padrão das lesões, muito semelhantes às descritas em casos de laringotraqueíte em galinhas, e na microscopia eletrônica (DAVISON, 2010).

Os pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), são aves marinhas migratórias que se reproduzem na Patagônia argentina e chilena, e também nas Ilhas Falkland/Malvinas, e migram rumo ao norte durante o inverno austral em busca de alimentos. Nesta migração anual se dispersam pelo Atlântico Sul chegando anualmente às praias brasileiras. (SICK, 2012; BIRDLIFE, 2012). Pinguins são bons indicadores do ambiente marinho e sensíveis aos

impactos antropogênicos em seu habitat (BOERSMA, 2008). Um grande número de pinguins encalha vivo ou morto nas praias brasileiras todos os anos e muitos deles são resgatados por centros de reabilitação ao longo da costa.

Embora infecções por herpesvírus tenham sido descritas em diferentes classes animais (DAVISON, 2010), a confirmação de ocorrência de infecção em pinguins nunca foi comprovada. No presente estudo nós descrevemos um surto de infecção por herpesvírus em pinguim de Magalhães, além de fornecer dados moleculares de uma nova espécie do vírus capaz de causar traqueíte hemorrágica em pinguins. A identificação genética de um herpesvírus causando doença respiratória aguda e morte em pinguins traz informações necessárias para a compreensão epizootica deste vírus, manejo de possíveis surtos da doença em cativeiro e em centros de reabilitação e, principalmente, no manejo pré-soltura.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Histórico do Caso

De 01 de junho a 24 de agosto, durante o inverno de 2011, 168 pinguins de Magalhães (17 adultos e 151 juvenis) com diferentes graus de petrolização foram admitidos no Centro de Reabilitação de Animais Marinhos (CRAM) na cidade de Rio Grande (32° 1' S; 52° 5' O)-RS. As aves foram recolhidas no monitoramento de praia realizado por instituições parceiras ao CRAM e advieram de diferentes localidades ao longo da costa do Estado do Rio Grande do Sul. Durante a temporada de reabilitação, 102 pinguins (60%) morreram. Um surto de doença respiratória ocorreu entre fins de junho e meados de julho acometendo 98 pinguins. Sessenta e sete deles foram submetidos à necropsia de acordo com protocolo estabelecido. Outros treze pinguins foram submetidos à eutanásia com 2mL IV de T61® (MSD Saúde Animal-São Paulo/Brasil) por apresentarem comprometimento respiratório severo. O CRAM funciona há muitos anos e nunca reportou um histórico similar a este. As licenças para colheita, transporte e processamento dessas amostras estão indicadas no item 3.1. Ao final da temporada, cinquenta e três pinguins reabilitados foram considerados aptos a soltura pela equipe local e foram soltos na praia do Cassino, localizada na região sul do Rio Grande do Sul.

4.2.2 Patologia

Amostras de tecidos fixadas em solução de formalina 10% por 48 horas foram enviadas para o Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (LAPCOM-FMVZ, USP), para análise histopatológica. As amostras foram cortadas, embebidas em parafina, seccionadas em uma espessura de 4 μ m, coradas com hematoxilina e eosina (H.E.) e analisadas sob microscopia óptica. Lâminas selecionadas contendo cortes de sacos aéreos e pulmão foram coradas com PAS (Periodic acid-Schiff) para diagnóstico diferencial de infecção fúngica.

4.2.3 Microscopia Eletrônica

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi realizada em amostras de dois pinguins enviadas para o *California Animal Health and Food Safety Laboratory System* (CAHFS) da Universidade da Califórnia, Davis, EUA localizado no campus de Tulare, Califórnia, EUA.

Porções de 1 mm³ de mucosa traqueal previamente fixadas em solução de formalina a 10% e embebidas em parafina foram desparafinizadas e fixadas em solução de glutaraldeído 2.5%, posteriormente fixadas em tetróxido de ósmio, desidratadas e finalmente embebidas em Epon. Seções ultrafinas (70 nm) foram coradas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados por microscopia eletrônica de transmissão segundo o protocolo descrito por Doane et al. (1987).

4.2.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica foi realizada em amostras de dois pinguins enviadas para o *California Animal Health and Food Safety Laboratory System* (CAHFS) da Universidade da Califórnia, Davis, EUA localizado no campus de Tulare, Califórnia, EUA. O protocolo

utilizado para a identificação da presença de antígenos anti-vírus da Laringo traqueíte infecciosa das galinhas nas amostras de traquéia foi descrito por Guy et al. (1992).

Porções de traqueia fixadas em formol e emblocadas em parafina foram cortadas com espessura de 4 micrômetros e colocadas sobre lâminas. As lâminas foram desparafinizadas com o uso de xilol e reidratadas por meio de lavagens com álcool em diferentes graus de diluição. Após a reidratação utilizou-se peróxido de hidrogênio hidratado para inibir a peroxidase. A recuperação do antígeno foi realizada aquecendo-se as lâminas em solução tampão de citrato (Diva Decloaker, Biocare Medical, Concord, CA) por 10 minutos em uma autoclave (Decloaker). O retorno da pressão e o resfriamento das lâminas foi realizado com a adição gradual de água deionizada. Após duas lavagens com solução TBS-Tween (tampão de Tris salino com Tween 20), regiões de ligação não específica foram bloqueadas com a utilização de solução comercial a base de caseína (Background Punisher, Biocare Medical, Concord CA). Anticorpo monoclonal murino direcionado contra o *Gallid herpesvirus 1*(A1), (gentilmente cedido pelo Dr. J. Guy) foi adicionado em uma diluição de 1:4000 por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a lavagem com solução TBS-Tween, as lâminas foram incubadas com polímero HRP-labeled anti-camundongo (Envision + System HRP Labeled Polymer Anti-Mouse, Dako, Carpinteria CA) por 30 minutos em temperatura ambiente. Substrato cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol (AEC Substrate Chromogen, Ready-to-Use, Dako, Carpinteria CA) foi adicionado às lâminas por 10 minutos seguido de lavagem com solução de TBS-Tween. As lâminas foram então coradas com Hematoxilina de Mayer e preparadas com solução aquosa de montagem e a lamínula permanente foi colocada após a secagem da solução.

4.2.5 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) e Análise Filogenética

Ao total foram analisadas 81 amostras sendo 53 macerados de traqueia dos animais necropsiados, e 28 *swabs* traqueais de animais vivos. O DNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito no item 3.4. Realizou-se a PCR como descrito no item 3.6 com os *primers* descritos no quadro 1 para herpesvírus. A reação de sequenciamento e análise dos resultados estão descritos nos itens 3.7 a 3.9.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Clínica e Patologia

Dos 168 pinguins resgatados e reabilitados no período, 98 (58,3%) foram acometidos. Todos os pinguins acometidos mostraram-se ofegantes, gravemente dispneicos, anoréxicos e expectoravam exsudato mucossanguinolento. Quatorze pinguins tiveram morte súbita em até 24 horas após darem entrada no Centro. A maioria das aves morreu, na mediana de duas semanas após o início dos sinais clínicos, e o prognóstico não foi alterado mesmo frente ao tratamento com antibioticoterapia à base de amoxicilina e ácido clavulânico (125mg/kg/BID). A maioria das mortes ocorreu entre 22 de junho e 14 de julho de 2011. Todas as aves que apresentaram sinais clínicos morreram ou foram eutanasiadas devido à dificuldade respiratória severa. O surto foi controlado após a introdução de medidas rigorosas de higienização e limpeza dos recintos, utensílios e fômites e isolamento dos animais acometidos. Houve também uma separação entre os voluntários que cuidavam dos pinguins enfermos e dos que tratavam daqueles que não apresentavam sinais clínicos, na tentativa de interromper a disseminação do patógeno.

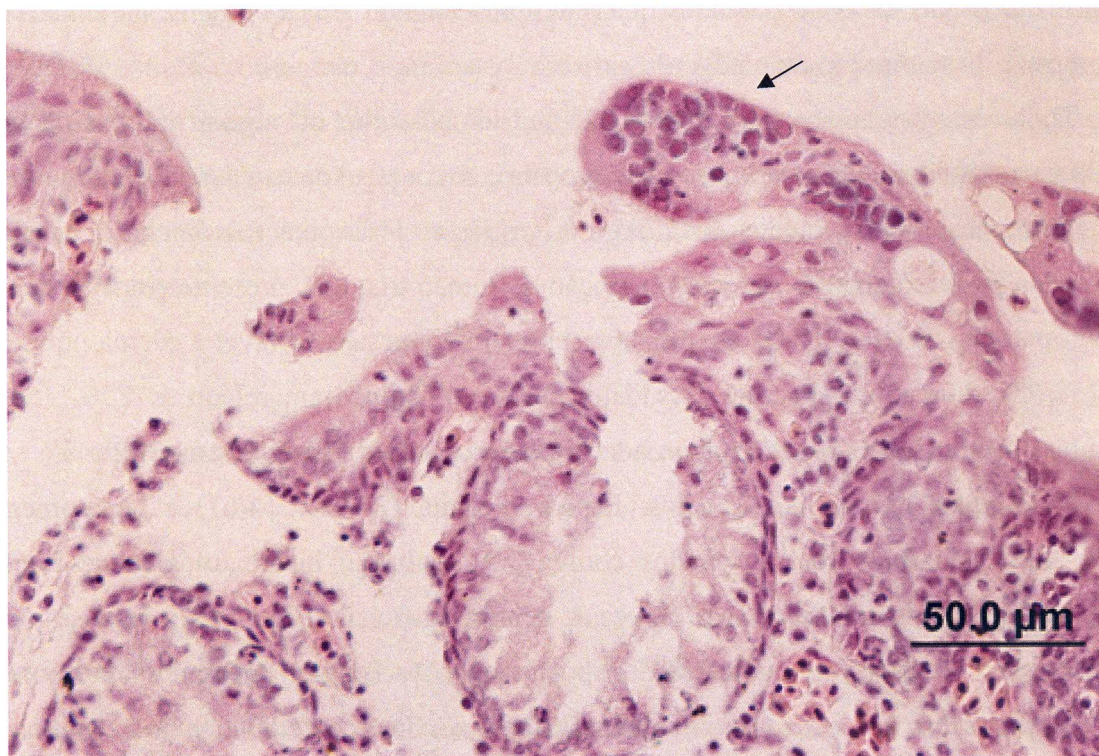
Todas as aves apresentavam condição nutricional ruim ou algum grau de caquexia baseado na ausência de tecido adiposo na necropsia e baixo peso da carcaça, que variou de 1,7 a 4,3 quilogramas, com média de 2,5kg. A principal lesão macroscópica foi traqueíte hemorrágica pseudomembranosa com obstrução do lúmen traqueal, presente em 41% (28/67) das necropsias analisadas. Todas as aves apresentaram congestão variável e edema pulmonar, 86% (58/67) drenaram ao corte exsudato pulmonar branco-amarelado e 83% (56/67) apresentaram espessamento severo com aderência de exsudato fibrinoso amarelado em sacos aéreos abdominais e torácicos caudais. Esplenomegalia (20,9%; 14/67) e hepatomegalia (14,9%; 10/67) também foram achados comuns. A avaliação histopatológica da traqueia revelou hiperplasia do epitélio com presença de células sinciciais (Figura 4.1), necrose focal e corpúsculos de inclusão intranucleares do tipo Cowdry A. Todos os pinguins apresentaram congestão pulmonar severa e hemorragia multifocal a coalescente. Pneumonia heterofílica aguda difusa, variando de discreta a severa, foi observada em 86% (58/67) dos pinguins analisados e 17,9% (12/67) das aves apresentaram pneumonia piogranulomatosa (Figura 4.2)

associada a aerossaculite micótica. Aerossaculite membranosa foi verificada em 56 dos 67 pinguins analisados (83,5%), sendo que em vários destes também foram visualizados corpúsculos de inclusão viral (Figura 4.3).

4.3.2 Microscopia Eletrônica

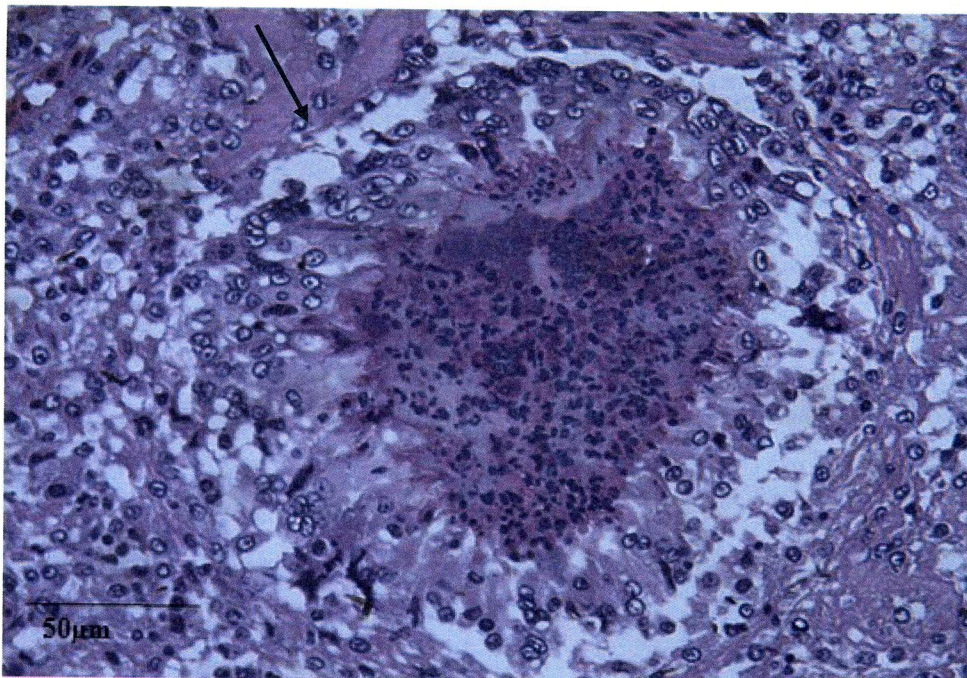
A microscopia eletrônica de transmissão dos cortes de traqueia fixados demonstrou que as inclusões intranucleares observadas na microscopia óptica consistiam em densos agregados de partículas virais (Figuras 4.4 e 4.5). Partículas do capsídeo viral envelopado, assim como envelopes vazios, foram visualizados tanto no núcleo quanto no citoplasma das células sinciciais com formato arredondado e seus tamanhos variaram de 99,6 a 101nm em sua forma imatura e de 126 a 149 nm com a presença do envelope.

Figura 4.1- Hiperplasia e necrose do epitélio traqueal de pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) com células sinciciais (seta) e inclusões intranucleares anfófilas. H&E



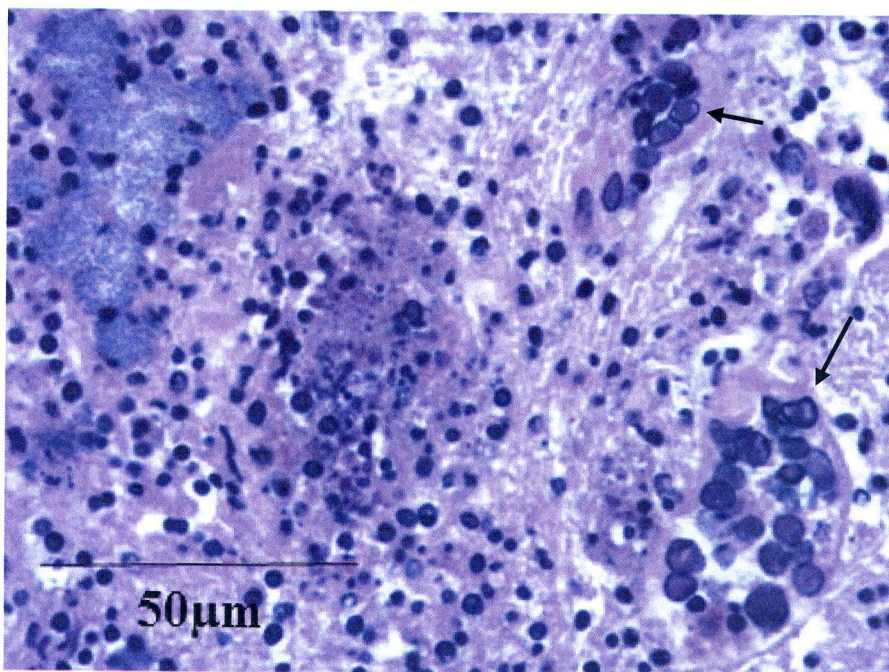
Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

Figura 4.2- Pulmão de *Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães) apresentando pneumonia piogranulomatosa com presença de células gigantes (seta). H&E.-São Paulo-2012



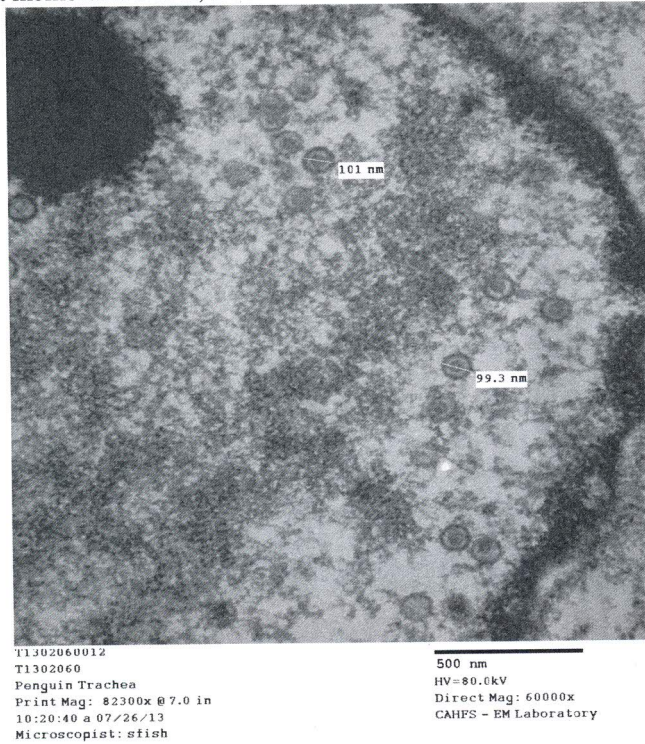
Fonte: (NIEMEYER, C., 2012)

Figura 4.3- Saco aéreo de *Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães) apresentando espessamento, corpúsculos de inclusão intranucleares anfófilicos (setas) e colônias bacterianas. H&E.-São Paulo-2012



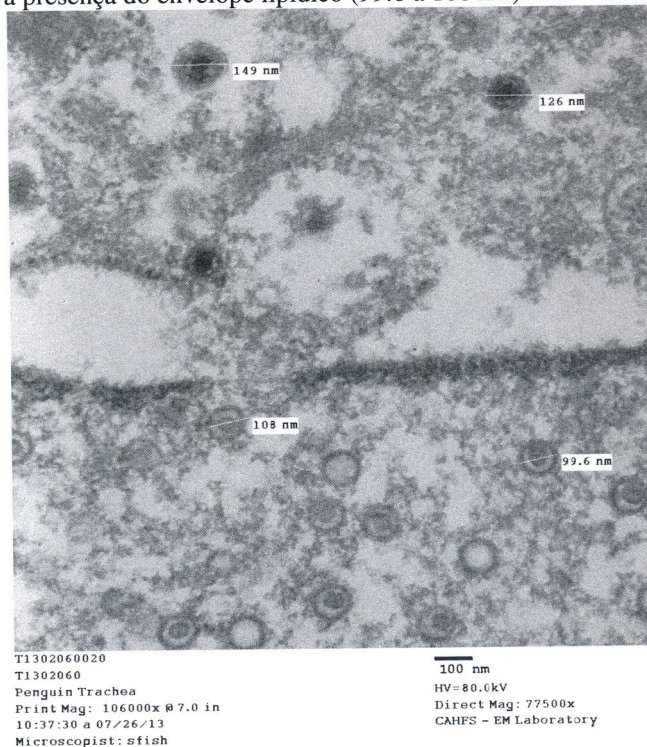
Fonte: (NIEMEYER, C., 2012)

Figura 4.4-Microscopia eletrônica de transmissão em cortes de epitélio traqueal de *Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães) demonstrando virions primários de herpesvírus com nucleocapsídeo envolto por uma única membrana-Davis, EUA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C. 2013)

Figura 4.5-Microscopia eletrônica de transmissão em epitélio traqueal de um *Spheniscus magellanicus* (pinguim de Magalhães) demonstrando virions de herpesvirus maduros com envelopes (126 a 149 nm) e outros imaturos sem a presença do envelope lipídico (99.6 a 108 nm). Bar = 100nm-Davis, EUA-2013



Fonte: (NIEMEYER, C. 2013)

A análise imuno-histoquímica das traqueias para o vírus da laringotraqueíte das galinhas foi negativa (Figuras 4.6 e 4.7), sugerindo que, por mais que as lesões histológicas visualizadas nos pinguins fossem muito semelhantes às lesões causadas pelo *Gallid herpesvirus 1* em aves de produção, o agente envolvido no surto não seria o mesmo.

Figura 4.6- Ensaio imuno-histoquímico negativo para marcação específica utilizando anticorpo monoclonal murino anti-*Gallid herpesvirus 1* em corte de traqueia de pinguim de Magalhães. Hematoxilina de Mayer-Davis-2013

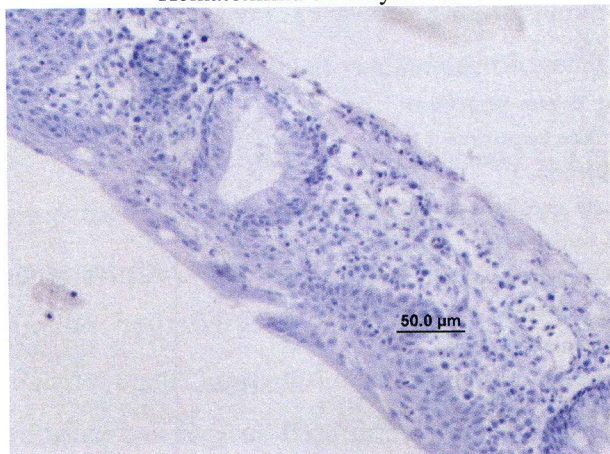
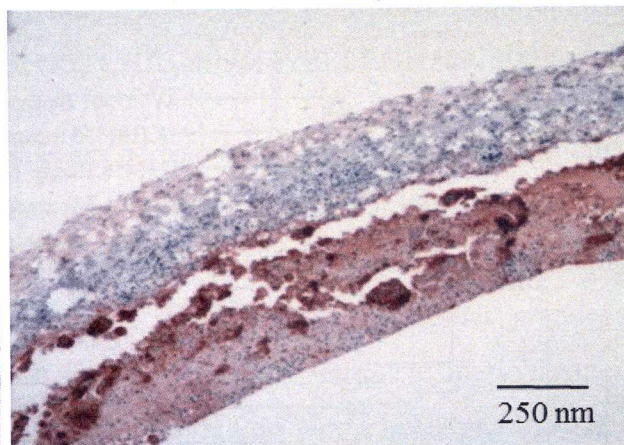


Figura 4.7- Controle positivo da imuno-histoquímica para marcação específica utilizando anticorpo monoclonal murino anti-*Gallid herpesvirus 1* realizada em corte de traquéia de galinhas (*Gallus gallus*) Hematoxilina de Mayer-Davis-2013



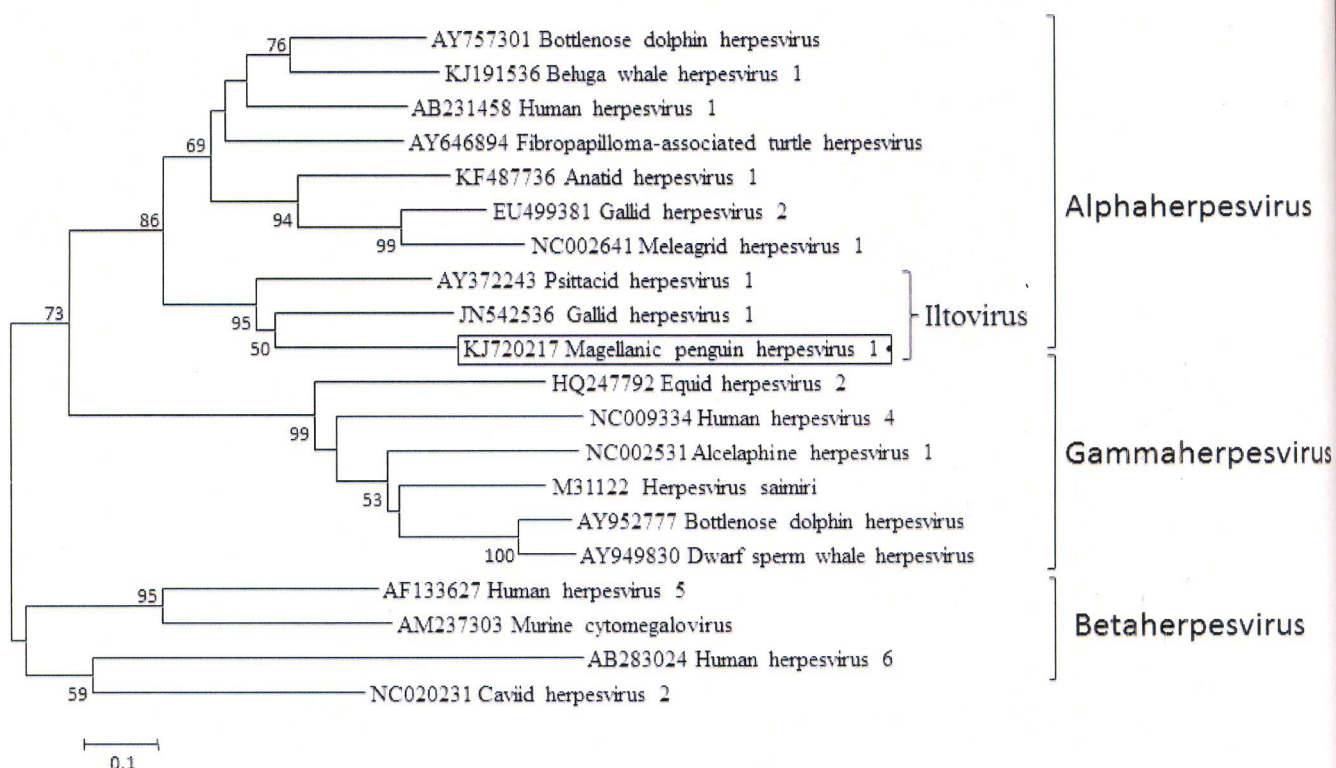
Fonte: (NIEMEYER, C., 2013)

Produtos de PCR de tamanho esperado foram amplificados de amostras de macerados de traqueia, pulmão e *swabs* de traqueia. Um fragmento de 460 pb referente à sequência parcial do gene da DNA polimerase dos herpesvírus foi detectado. A busca na base de dados NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) identificou 100 sequências com algum grau de semelhança dentre as quais o único herpesvírus aviário foi o *Psittacid herpesvirus 1* com um grau de semelhança de 71% em uma cobertura de 53%. Outras sequências interessantes foram *Beluga whale herpesvirus 1* (76% de semelhança), *Bovine herpesvirus 5* (75% de semelhança) e *Human herpesvirus 1* (66%). A sequência identificada nos pinguins foi submetida ao GenBank (Número de acesso: KJ720217) e denominada *Magellanic penguin herpesvirus 1* (MagHV-1), por se tratar do primeiro relato na espécie e pela ausência de dados genéticos do *Spheniscid herpesvirus 1* para comparação.

A análise filogenética da sequência obtida, comparada com outras 19 sequências disponíveis no GenBank e que caracterizam subfamílias virais segundo o ICTV, demonstrou

que o MagHV-1 associado à traqueíte hemorrágica nos pinguins corresponde a uma nova espécie semelhante às do gênero *Iltovirus*, compreendido pelas espécies *Psittacid herpesvirus 1*, *Gaviid herpesvirus 1* e *Gallid herpesvirus 1*, os quais causam doenças respiratórias tanto em mergulhões (*Gavia* spp.) como em galinhas. Assim sugere-se que o *Magellanic penguin herpesvirus 1* possa ser classificado como pertencente à subfamília *Alphaherpesvirinae*, Gênero *Iltovirus*, conforme demonstrado nas figuras 4.8.

Figura 4.8 - Análise filogenética do *Magellanic penguin herpesvirus 1* identificado em macerado de traqueia de pinguins de Magalhães no Rio Grande do Sul, Brasil. A árvore contendo sequências de 136 aminoácidos do gene codificador da DNA polimerase e de representantes das três subfamílias virais foi gerada pelo método de *Neighbour-joining* com 1000 repetições de *bootstraps*.



Fonte: (NIEMEYER, C. 2014)

4.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

As lesões macroscópicas e microscópicas observadas no sistema respiratório dos pinguins-de-Magalhães deste relato são consistentes com as alterações clínicas já descritas pela infecção por herpesvírus em diversas espécies de aves (RITCHIE, 1995; KALETA, 2007; QUESADA, 2011). Há relato de doença respiratória em pinguins africanos em cativeiro, porém não houve caracterização molecular do agente envolvido (KINCAID, 1988).

No presente estudo foi caracterizado um herpesvírus responsável por severas alterações clínicas respiratórias e morte de 97 pinguins de Magalhães no CRAM Rio Grande do Sul, Brasil. Sugere-se que este vírus seja denominado *Magellanic penguin herpesvirus 1* (MagHV-1).

O padrão das lesões encontradas nos pinguins, incluindo a presença de corpúsculos de inclusão intranuclear e aglomerados de células sinciciais com núcleo anfofílico, é condizente com o padrão de enfermidades descritas por herpesvírus do gênero *Iltovirus*, tais como o *Gallid herpesvirus 1* (GaHV -1) ou vírus da laringotraqueíte das galinhas, e o *Passerid herpesvirus 1* (PaHV-1) causador de traqueíte em diamante-de-gould (*Erythrura gouldiae*), o que também foi verificado na análise filogenética (RITCHIE, 1995; WELLENHAN, 2003).

A análise filogenética se baseou não apenas em herpesvírus aviários, mas também em espécies que acometem animais marinhos e representantes de cada subfamília. Dentre as espécies que acometem aves marinhas o *Magellanic penguin herpesvirus 1* agrupou com o *Gaviid herpesvirus 1* (GavHV-1), causador de doença respiratória em mabelhas grandes (*Gavia immer*) que foram reabilitadas no litoral da Florida - EUA, uma ave marinha que nidifica nas regiões frias do ártico e habita a costa da América do Norte (EUA e Canadá), Inglaterra, e região costeira norte da Europa, desde a costa da França até a Noruega (QUESADA, 2011). Em ambos os casos, infecções bacterianas e fúngicas secundárias foram observadas nas aves acometidas, o que agravou o estado geral das mesmas.

Os herpesvírus comumente apresentam uma alta prevalência em seu hospedeiro natural e estabelecem infecções latentes por toda a vida se alojando no gânglio do nervo trigêmio (WILLIAMS, 1992; KALETA, 2007). A reativação viral geralmente ocorre em quadros de imunossupressão e pode estar associada a altos níveis de estresse tais como manutenção em cativeiro ou intoxicação por poluentes químicos (GOLDBERG, 1990; QUESADA, 2011). Embora a origem do *Magellanic herpesvirus 1* (MagHV-1) descrito neste trabalho seja desconhecida, o padrão agudo de mortalidade observado sugere que os animais não tiveram contato prévio com este genótipo viral. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que as aves apresentassem o vírus em estado de latência e que tenham desenvolvido a enfermidade devido aos efeitos imunossupressores tanto da contaminação por petróleo quanto do estresse da reabilitação. Análises como o isolamento viral também são necessárias para a melhor compressão deste novo vírus aqui identificado.

Investigações sobre a ocorrência ou não de herpesvírus na população de pinguins de Magalhães saudável e de vida livre, e o monitoramento contínuo dos centros de reabilitação do país, devem ser conduzidos para melhorar o esclarecimento desta ocorrência e verificar a prevalência de herpesvírus nas aves marinhas que chegam a costa brasileira.

REFERÊNCIAS

- BIRDLIFE INTERNATIONAL *Spheniscus magellanicus*. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014. Disponível em: <www.iucnredlist.org> Acesso em: 23 jun. 2014.
- BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. **BioScience**, v. 58, n. 7, p. 597-607, 2008.
- DAVISON, A. J. Herpesvirus systematic. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 52-69, 2010.
- DOANE, F. W.; ANDERSON, N. **Electron microscopy in diagnostic virology: a practical guide and atlas**. Cambridge: Cambridge University Press, 1987. p. 10-34.
- FUCHS, W.; VEITS, J.; HELFERICH, D.; GRANZOW, H.; TEIFKE, J. P.; METTENLEITER, T. C. Molecular biology of avian infectious laryngotracheitis virus. **Veterinary Research**, v. 38, p. 261-279, 2007.
- GABOR, M.; GABOR, L. J.; PEACOCK, L.; SRIVASTAVA, M.; ROSENWAX, A.; PHALEN, D. Psittacid herpesvirus 3 infection in the Eclectus Parrot (*Eclectus roratus*) in Australia. **Veterinary Pathology**, v. 50, n. 6, p. 1053-1057, 2013.
- GOLDBERG, D. R.; YUILL, T. M.; BURGESS, E. C. Mortality from duck plague virus in immunosuppressed adult Mallard ducks. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 26, p. 299-306, 1990.
- GUY, J. S.; BARNES, H. J.; SMITH, L. G. Rapid diagnosis of infectious laryngotracheitis using a monoclonal antibody-based immunoperoxidase procedure. **Avian Pathology**, v. 21, n. 1, p. 77-86, 1992.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Disponível em: <www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 10 set. 2014.
- KALETA, E. F.; DOCHERTY, D. E. Avian herpesvirus. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious diseases of wild birds**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 63-86.
- KINCAID, A. L.; BUNTON, T. E.; CRANFIELD, M. Herpesvirus-like infection in Black-footed penguins (*Spheniscus demersus*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 1, p. 173-175, 1988.

MENENDEZ, K. R.; GARCIA, M.; SPATZ, S.; TABLANTE, N. L. Molecular epidemiology of infectious laryngotracheitis: a review. **Avian Pathology**, v. 43, n. 2, p. 108-117, 2014.

QUESADA, R. J.; HEARD, D. J.; AITKEN-PALMER, C.; HALL, N.; CONLEY, K. J.; CHILDRESS, A. L.; WELLEHAN JR., J. F. X. Detection and phylogenetic characterization of a novel herpesvirus from the trachea of two stranded common loons (*Gavia immer*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 1, p. 233-239, 2011.

RITCHIE, B. W.; CARTER, K. **Avian viruses: function and control**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1995. 525p.

SHIVAPRASAD, H. L.; PHALEN, D. N. A novel herpesvirus associated with respiratory disease in Bourke's parrots (*Neopsephotus bourkii*). **Avian Pathology**, v. 41, n. 6, p. 531-539, 2012.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THUREEN, D. R.; KEELER JR., C. L. Pstittacid herpesvirus 1 and infectious laryngotracheitis virus: comparative genome sequence analysis of two avian alphaherpesvirus. **Journal of Virology**, v. 80, n. 16, p. 7863-7872, 2006.

VANDEVANTER, D. R.; WARRENER, P.; BENNETT, L.; SCHULTZ, E. R.; COULTER, S.; GARBER, R. L.; ROSE, T. M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primers PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, 1996.

WELLENHAN, J. F. X.; GAGEA, M.; SMITH, D. A.; TAYLOR, W. M.; BERHANE, Y.; BIENZLE, D. Characterization of a herpesvirus associated with tracheitis in Gouldian Finches (*Erythrura gouldiae*). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4054-4057, 2003.

WILLIAMS, R. A.; BENNETT, M.; BRADBURY, J. M.; GASKELL, R. M.; JONES, R. C.; JORDAN, F. T. W. Demonstration of sites of latency of infectious laryngotracheitis virus using the polymerase chain reaction. **Journal of General Virology**, v. 73, p. 2415-2420, 1992.

5 HERPESVÍRUS EM AVES MARINHAS DA COSTA ATLÂNTICA DA AMÉRICA DO SUL

5.1 INTRODUÇÃO

Herpesvírus (HV) são patógenos importantes que apresentam distribuição mundial e são capazes de infectar uma variedade muito grande de espécies animais desde mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes, até ostras e moluscos (DAVISON, 2010). Nas aves de vida livre, a infecção por HV já foi identificada em mais de 100 diferentes espécies. Por outro lado, atualmente desconhece-se a capacidade infectante dos herpesvírus em uma diversidade grande de hospedeiros. Acredita-se que infecções naturais apresentem uma baixa variabilidade, porém alguns HV podem infectar aves de diferentes espécies, Famílias e até mesmo Ordens. O *Suid herpesvirus 1*, por exemplo, causador de enfermidade discreta em suínos e outros mamíferos, causa enfermidade severa e alta mortalidade quando experimentalmente inoculado em galinhas e pombos (KALETA, 2007).

Diferentes herpesvírus já foram identificados como causadores de enfermidades respiratórias, entéricas, e mortalidade entre as aves marinhas e aquáticas, como por exemplo o *Anatid herpesvirus 1*, causador da peste dos patos; *Ciconiid herpesvirus 1*, que acomete cegonhas; *Gruid herpesvirus 1*, que acomete grou; *Phalacrocoracid herpesvirus 1*, que acomete biguás; *Spheniscid herpesvirus 1*, acometendo pinguins africanos; *Frigatebird herpesvirus 1*, acometendo fragatas; e *Gaviid herpesvirus 1* acometendo mobilhas (KALETA, 2007; THOISY, 2009; DAVISON, 2010; QUESADA, 2011).

Segundo Kaleta et al. (2007), a investigação de HV deveria ser incorporada aos programas de monitoramento de saúde de aves selvagens. Uma vez que a migração, a reabilitação e a translocação de aves interferem na disseminação e concentração de agentes patogênicos entre diferentes populações, buscou-se investigar a ocorrência de herpesvírus em populações de aves marinhas assintomáticas. Foram avaliados animais de vida livre nas colônias reprodutivas de pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) na Patagônia argentina e nos ninhais de atobás (*Sula leucogaster* e *Sula dactylatra*) e grazinas (*Phaeton aethereus*) no Arquipélago de Abrolhos, e também nas diferentes espécies de aves marinhas resgatadas pelos Centros de Reabilitação parceiros deste projeto.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Animais

Ao total foram analisadas 409 amostras como demonstrado na tabela 5.1.

Tabela 5.1- Números absolutos de amostras analisadas para a pesquisa de herpesvírus nas diferentes espécies de aves marinhas, distribuídas em função do local de colheita e faixa etária. São Paulo, 2011/2013

	Local	Espécie	Nome popular	Faixa etária	N analisado
Vida Livre	Arquipélago de Abrolhos - BA (17°25' a 18°09' S e 38°33' a 39°05' O)	<i>Sula dactylatra</i>	Atobá branco	Adulto	23
		<i>Sula leucogaster</i>	Atobá marrom	Adulto	20
		<i>Phaeton aethereus</i>	Grazina do bico vermelho	Adulto	29
		<i>Phaeton lepturus</i>	Grazina do bico laranja	Adulto	4
	Patagônia argentina	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães	Adulto	144
	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães	Ninhego	31	
Centros de Reabilitação	Centro de Recuperação de Animais Marinhos-CRAM, RS	<i>Thalassarche chlororhynchos</i>	Albatroz de nariz amarelo	Adulto	12
		<i>Macronectes giganteus</i>	Petrel gigante	Juvenil	2
	R3 Animal e Centro de Traigem de Animais Silvestres do Núcleo de Fauna de Florianópolis, SC	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães	Adulto e Juvenil	89
		<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães	Adulto e Juvenil	49
	Instituto de Pesquisa e Reabilitação Animal - IPRAM, ES	<i>Spheniscus magellanicus</i>	Pinguim de Magalhães	Adulto e Juvenil	6

Fonte: (NIEMEYER, C. 2014)

5.2.5 PCR e Análise Filogenética

As amostras foram coletadas, armazenadas e processadas conforme descrito nos itens 3.2 a 3.9.

5.3 RESULTADOS

Das 409 amostras de aves analisadas desde o estado da Bahia até a Patagônia argentina, 49 foram PCR positivas (11.9%) para herpesvírus. A relação de positivos para herpesvírus por espécie e local amostrado está demonstrada na tabela 5.2.

Fragmentos de 460 pb referentes à sequência parcial do gene UL30 codificador da DNA polimerase dos herpesvírus foram detectados nas diferentes espécies e sequências genéticas foram obtidas a partir de amostras de atobá branco, albatroz de nariz amarelo e pinguim de Magalhães, sendo que dentre as amostras de pinguins foram identificados mais de um genótipo de herpesvírus. Todos os herpesvírus identificados neste estudo podem ser classificados como pertencentes a subfamília Alphaherpesvirinae. A análise filogenética das sequências obtidas foi elaborada comparando-as com outras 29 sequências disponíveis no GenBank. A escolha das sequências foi baseada em sequências padrão que caracterizam as subfamílias virais segundo o ICTV, e sequências de herpesvírus ainda não classificados, mas que tenham sido identificadas em aves e mamíferos marinhos (Figura 5.1).

As sequências foram depositadas no Genbank e, por serem as primeiras sequências depositadas de tais gêneros de aves marinhas, propusemos que fossem denominadas como *Sulid herpesvirus 1*, para o genótipo identificado nos atobás; *Thalassarchid herpesvirus 1*, para o genótipo identificado no albatroz de nariz amarelo, e *Magellanic penguin herpesvirus 1* e *Magellanic penguin herpesvirus 2* para os genótipos identificados nos pinguins de Magalhães.

O *Sulid herpesvirus 1* (Genbank número KP003804) foi identificado em 5 aves, sendo dois atobás brancos, um atobá marrom e duas grazinas, aparentemente saudáveis e que tinham filhotes em seus ninhos no Arquipélago de Abrolhos, BA. Na análise filogenética, este genótipo apresentou 65% de semelhança com o *Fregata magnificens herpesvirus 1*

(FmagHV) identificado em fragatas nas ilhas da Nova Guiana (THOISY, 2009) e 76% de semelhança com o *Vulture herpesvirus* (VHV), identificado em urubus na Ásia. Ambos os vírus foram identificados a partir de carcaças e, nas fragatas, este genótipo de herpesvirus causou alterações cutâneas e ósseas.

Tabela 5.2- Pesquisa de herpesvírus em aves marinhas, distribuídas em função do local de colheita, tipo de amostra, amostragem e positividade. São Paulo, 2011/2013

Local	Espécie	Tipo de amostra	N positivos/total	Positivos (%)
Argentina	Pinguim de Magalhães			
La Ernestina		Swab - ninhego	1/1 (1 pool)	100
Punta Tombo		Swab - ninhego	1/2 (2 pools)	50
Cabo Dos Bahias		Swab - ninhego	1/2 (2 pools)	50
		Swab - adultos	1/8 (8 pools)	12,5
Bahia Bustamante		Swab - ninhego	1/1 (1 pool)	100
		Swab - adultos	1/8 (8 pools)	12,5
Arquipélago de Abrolhos	Atobá	Swab - adulto	2/23	8,6
	Branco			
	Atobá	Swab - adulto	1/20	5
	Marrom			
	Grazina do bico vermelho	Swab - adulto	2/29	6,8
CRAM	Albatroz de bico amarelo	Swab - adulto	1/12	8,3
	Petrel gigante	Swab - adulto	0/2	0
	Pinguim de Magalhães	Swab - adulto	15/36	41,6
		Macerados - adulto	19/53	35,8
R3 Animal	Pinguim de Magalhães	Swab - adulto	8/31	25,8
		Macerados - adulto	1/18	5,5
IPRAM	Pinguim de Magalhães	Macerados - adulto	0/6	0

Fonte: (NIEMEYER, C. 2014)

O *Thalassarchid herpesvirus 1* foi identificado em um dos 12 albatrozes de nariz amarelo que foram encontrados nas praias do Rio Grande do Sul, após uma tempestade oceânica em março de 2013. As aves estavam aparentemente saudáveis, e foram levadas ao CRAM pela equipe que realiza o monitoramento das praias na região. Após receberem cuidados básicos, as aves foram soltas em até 3 dias.

O *Magellanic penguin herpesvirus 1* foi identificado em um surto de enfermidade respiratória aguda dentro do CRAM em julho de 2011 que culminou na morte de mais de 50% dos pinguins daquele ano, como descrito no item 4.

O *Magellanic penguin herpesvirus 2* foi identificado tanto em ninhegos como em pinguins de Magalhães adultos que se reproduziam na Patagônia argentina. Todos os animais amostrados nas colônias estavam aparentemente saudáveis. Este genótipo viral também foi identificado em três pinguins no centro de reabilitação R3 Animal, sendo um deles no *swab* traqueal, amostrado assim que a ave adentrou ao Centro, e os outros dois em macerado de pulmão.

5.4 DISCUSSÃO

Neste estudo foram encontrados quatro diferentes genótipos de *Herpesvirus*, sendo todos pertencentes a sub-família Alphaherpesvirinae, em aves marinhas das ordens Suliformes, Sphenisciformes, Pelecaniformes e Procelariiformes. Outros estudos em aves marinhas já identificaram surtos causados por *Herpesvirus* em fragatas (Pelecaniformes) (THOISY, 2009) e em mabelhas (Gaviiformes) (QUESADA, 2011). A identificação dos vírus nas aves marinhas de vida livre geralmente está associada a ocorrência de mortalidade tanto em ninhas quanto em centros de reabilitação. No presente estudo, identificamos a presença de herpesvírus tanto em aves que estavam em reabilitação quanto em amostras de *swabs* traqueais de aves aparentemente saudáveis e que estavam ativas em seus sítios reprodutivos.

A análise filogenética demonstrou que o *Sulid herpesvirus 1* (SuHV1) se agrupou juntamente com o FmagHV e VHV1. Desta forma, espera-se que caso venha a manifestar algum tipo de alteração clínica, esta esteja relacionada com o padrão cutâneo. O herpesvírus descrito nas fragatas foi identificado nas Ilhas Grand Connétable (4° 49' 30''N, 51° 56'00''O), ilhas rochosas localizadas próximo ao Equador no Atlântico Norte, o único local de nidificação da espécie entre Tobago e Fernando de Noronha. Embora as fragatas não sejam aves migratórias e tampouco pesquem em alto mar, elas interagem bastante com outras aves marinhas forçando-as a regurgitarem seu alimento e roubando-o. Assim, as fragatas normalmente ingerem saliva e fluidos corpóreos de outras aves podendo facilmente se infectar por esta via (SICK, 2001; THOISY, 2009). No Arquipélago de Abrolhos, onde estas amostras

foram coletadas, existe também uma colônia de fragatas nidificando na Ilha Redonda. Até o momento não se sabe se esta população apresenta infecção por herpesvírus, porém nenhum quadro clínico condizente foi verificado desde 2011 quando iniciou-se o monitoramento do estado de saúde nas aves das ilhas (comunicação pessoal)¹.

O *Magellanic penguin herpesvirus 1* (MagHV-1) se agrupou com o *Gaviid herpesvirus 1* (GavHV1) e próximo aos herpesvírus do gênero *Iltovirus*, como esperado. O processo que este vírus causou nos pinguins se assemelha, em muito, ao quadro de laringotraqueíte infecciosa das galinhas causado pelo *Gallid herpesvirus 1*. Já o *Thalassarchid herpesvirus 1* (ThHV-1) e o *Magellanic penguin herpesvirus 2* (MagHV-2) se agruparam próximo ao *Herpesvirus* humano do gênero *Simplex*.

Embora o genótipo MagHV-2 encontrado nas colônias de pinguins seja distinto (50% de semelhança) do *Magellanic penguin herpesvirus 1* (MagHV-1) identificado no surto de doença respiratória no CRAM, não se pode descartar a hipótese de que as aves possam apresentar mais de um genótipo de herpes adaptado aos pinguins, como já foi demonstrado em golfinhos, onde dois diferentes *Herpesvirus* foram isolados de um mesmo animal (BENSON, 2006).

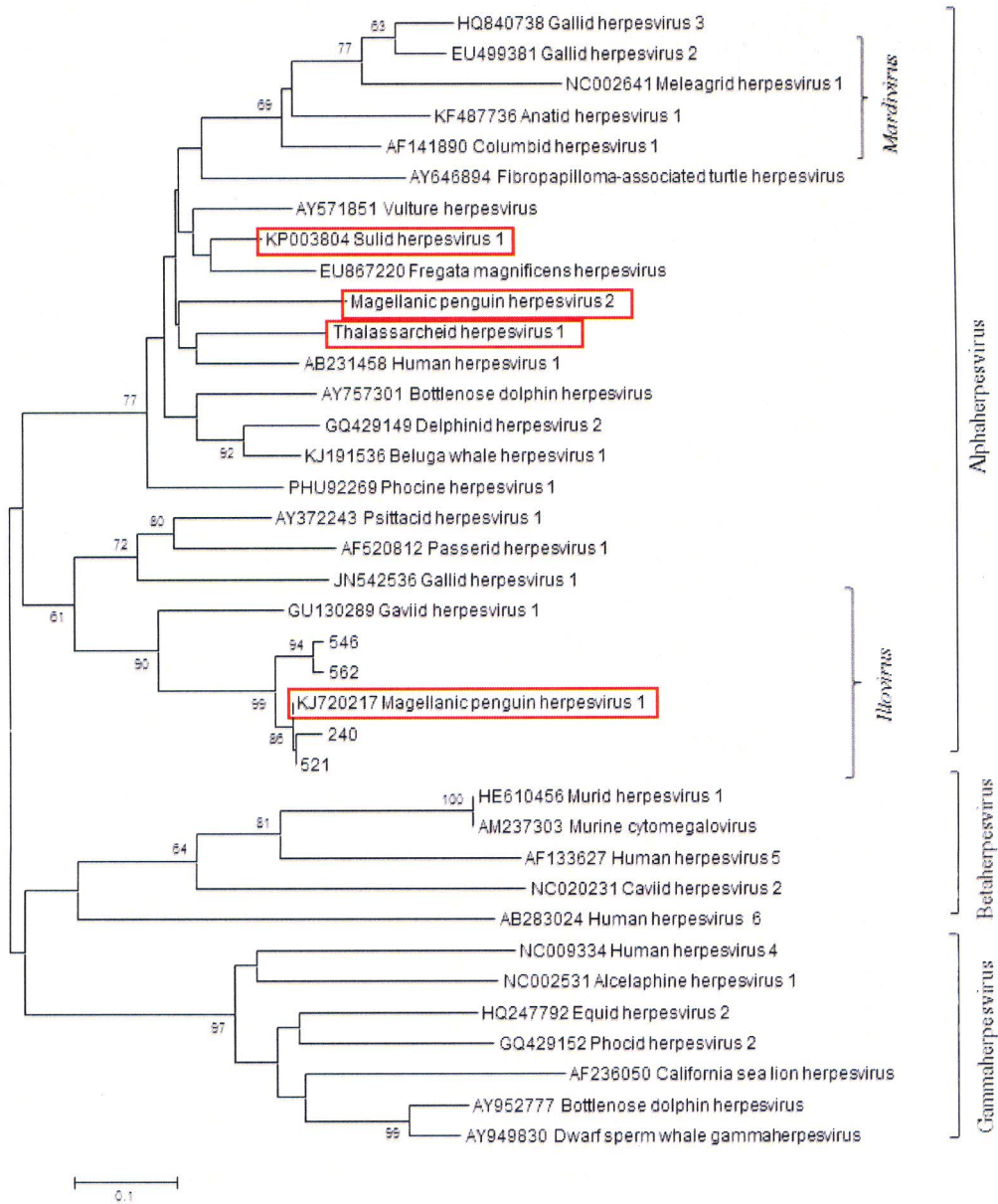
Os herpesvírus normalmente apresentam uma alta prevalência em seu hospedeiro natural e estabelecem infecções latentes por toda a vida (WILLIAMS, 1992; KALETA, 2007). A prevalência no presente estudo variou de 5 a 50%, porém a forma de agrupamento das amostras em *pools* realizada na Argentina, e o pequeno número de amostras obtido de algumas espécies, não permitem que este estudo discuta índices de prevalência. Estudos representativos das populações como um todo devem ser conduzidos para abordar este tema. Contudo, o fato de termos encontrado aproximadamente 12% de aves positivas em uma busca inicial pelo vírus ao longo da costa sugere que a ocorrência deste nas populações possa ser alto.

¹ Informação cedida em outubro de 2014 por Cesar Musso, Coordenador da Avidepa (Associação Vila-velhense de Proteção Ambiental) e responsável, juntamente com o ICMBio, pelo Monitoramento do Parque Nacional Marinho dos Abrolhos.

5.5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou a ocorrência de *Herpesvirus* em diferentes espécies de aves marinhas ao longo da costa atlântica da América do Sul. Sabe-se que a ocorrência de surtos com mortalidade em populações de aves selvagens pode estar comumente relacionada à imunossupressão causada por poluição aguda ou crônica do habitat e/ou associada a agentes infecciosos (CARDOSO, 2005; KALETA, 2007; THOISY, 2009). Uma vez identificada a presença latente de herpesvírus nas espécies marinhas que habitam a Costa brasileira, podemos esperar que alterações, sejam ambientais ou fisiológicas, capazes de causar uma imunossupressão nas aves possam predispor as mesmas à ocorrência de surtos e mortalidade. Os resultados obtidos neste trabalho de investigação de *Herpesvirus* em aves marinhas da costa atlântica da América do Sul revelam a necessidade de monitoramento intenso nestas populações, principalmente frente à intensificação da exploração petrolífera na plataforma continental brasileira.

Figura 5.1- Análise filogenética dos *Herpesvirus* identificados (destacados em quadros) em *swabs* de traqueia e macerados de aves marinhas ao longo da costa Atlântica da América do Sul. A árvore contendo seqüências de 100 aminoácidos de representantes das três subfamílias virais foi gerada pelo método de *Neighbour-joining* com 1000 repetições de *bootstraps*



Fonte: (NIEMEYER, C. 2014)

REFERÊNCIAS

- BENSON, K. A. S.; MANIRE, C. A.; EWING, R. Y.; SALIKI, J. T.; TOWNSEND, F. I.; EHLERS, B.; ROMERO, C. H. Identification of novel alpha- and gammaherpesviruses from cutaneous and mucosal lesions of dolphins and whales. **Journal of Virological Methods**, v. 136, p. 261-266, 2006.
- CARDOSO, M.; HYATT, A.; SELLECK, P.; LOWTHER, S.; PRASKASH, V.; PAIN, D.; CUNNINGHAM, A. A.; BOYLE, D. Phylogenetic analysis of the DNA polymerase gene of a novel alphaherpesvirus isolated from an Indian Gyps vulture. **Virus Genes**, v. 30, p. 371-381, 2005.
- DAVISON, A. J. Herpesvirus systematic. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 52-69, 2010.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). Disponível em: <www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>. Acesso em: 10 set. 2014.
- KALETA, E. F.; DOCHERTY, D. E. Avian herpesvirus In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious diseases of wild birds**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 63-86.
- KINCAID, A. L.; BUNTON, T. E.; CRANFIELD, M. Herpesvirus-like infection in Black-footed penguins (*Spheniscus demersus*) **Journal of Wildlife Diseases**, v. 24, n. 1, p. 173-175, 1988.
- QUESADA, R. J.; HEARD, D. J.; AITKEN-PALMER, C.; HALL, N.; CONLEY, K. J.; CHILDRESS, A. L.; WELLEHAN JR., J. F. X. Detection and phylogenetic characterization of a novel herpesvirus from the trachea of two stranded common loons (*Gavia immer*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 47, n. 1, p. 233-239, 2011.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.
- THOISY, B.; LAVERGNE, A.; SEMELIN, J.; POULIQUEN, J. F.; BLANCHARD, F.; HANSEN, E.; LACOSTE, V. Outbreaks of disease possibly due to a natural avian herpesvirus infection in a colony of young magnificent frigatebirds (*Fregata magnificens*) in French Guiana. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 45, n. 3, p. 802-807, 2009.
- VANDEVANTER, D. R.; WARRENER, P.; BENNETT, L.; SCHULTZ, E. R.; COULTER, S.; GARBER, R. L.; ROSE, T. M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primers PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, 1996.

6 DOIS DIFERENTES AVIPOX VÍRUS ASSOCIADOS À BOUBA AVIÁRIA EM PINGUINS DE MAGALHÃES (*SPHENISCUS MAGELLANICUS*) AO LONGO DA COSTA BRASILEIRA²

6.1 INTRODUÇÃO

Os poxvírus são DNA vírus de dupla fita constituídos de um grande genoma [260-365kb] e que apresentam distribuição mundial. Atualmente são classificados em duas subfamílias dentro da família Poxviridae: a Entomopoxvirinae e a Chordopoxvirinae, na qual o gênero *Avipox* está incluído. Dentro do gênero *Avipox*, existem, até o momento, dez espécies identificadas de *Avipox*, sendo o *fowlpox* e *canarypox* os mais comumente descritos (STANNARD, 1998; BOLTE, 1999; JARMIN, 2006). A transmissão pode ocorrer por contato direto de partículas virais ou tecido infectado com a pele lesionada, conjuntivas ou mucosas; ou indiretamente por um vetor mecânico, como picadas de insetos (HANSEN, 1999; KANE, 2012). A enfermidade pode evoluir de formas distintas, sendo que a mais comum é caracterizada por lesões verrucosas proliferativas na pele, onde infecções bacterianas e fúngicas secundárias podem agravar o quadro clínico da ave. A segunda forma de pox descrita nas aves é o padrão diftérico, caracterizado por lesões nas mucosas do aparelho digestório e respiratório superior (HANSEN, 1999; JARMIN, 2006). Embora a infecção por *Avipox* já tenha sido descrita em 278 diferentes espécies dentre 23 diferentes ordens de aves, as características moleculares e biológicas dos vírus ainda não são completamente elucidadas (WELI, 2011; KANE, 2012). Neste trabalho, foram identificados dois genótipos divergentes de *Avipox* causando alterações clínicas em pinguins de Magalhães em duas regiões distantes do litoral brasileiro no mesmo período do ano.

² Trabalho publicado em revista internacional: Niemeyer, C.; Favero, C.; Kolesnikovas, C.; Bhering, R.; Brandão, P.; Catão-Dias, J. Two different avipoxviruses associated with pox disease in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) along the Brazilian coast. *Avian Pathology*, v. 42, p. 546-551, 2013.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Histórico

Durante a temporada de inverno de 2012, um total de 129 pinguins de Magalhães (7 adultos e 122 jovens; plumagem de primeiro ano) foram alojados em recintos externos em um Centro de Reabilitação de Animais Silvestres [CETAS (Centro de Triagem de Animais Selvagens) mantido pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) e a Polícia Militar Ambiental do estado de Santa Catarina], na região sul do Brasil (Florianópolis, Santa Catarina (SC); 27° 35' 49" Sul, 48° 32' 58" Oeste). As aves foram encaminhadas ao centro de reabilitação após encalharem nas praias apresentando diferentes graus de contaminação por petróleo nas penas e/ou emagrecimento severo, entre os meses de junho a dezembro de 2012. Neste período, oito pinguins desenvolveram lesões verrucosas ulcerativas na região de pálpebra e bico (Figura 6.1). A suspeita de infecção por poxvírus foi devidamente relatada à equipe de reabilitação e após a confirmação de infecção pelo vírus por reação em cadeia da polimerase (PCR), as aves foram sedadas com a administração intramuscular de 30mg/kg de cetamina e 2mg/kg de xilazina e foi realizada a eutanásia humanitária com a administração intravenosa de 2 mL de T61® (MSD Saúde animal, São Paulo, Brasil). As carcaças foram prontamente submetidas a necropsia pela equipe veterinária local.

No início de janeiro de 2013, um centro de reabilitação localizado em Vila Velha, Espírito Santo (ES) (20° 19' 20" Sul, 40° 20' 17" Oeste), a 1.700 km de distância de Florianópolis, relatou a ocorrência de lesões cutâneas em áreas aptéricas em três pinguins que estavam em reabilitação. As lesões de um dos pinguins foram cirurgicamente removidas, congeladas e enviadas para o LAPCOM (Laboratório de Patologia Comparada de Animais Selvagens). Após a confirmação de infecção por *Avipox* por meio de PCR, o pinguim foi humanamente eutanasiado, como descrito anteriormente, e a necropsia foi realizada pela equipe veterinária local.

Do total de dezessete pinguins que apresentaram lesões cutâneas (SC190, SC250, SC 252, SC271, SC272, SC273, SC286, SC288, SC268, SC290, SC315, SC324, SC377, SM137,

ES140, ES149 e ES134), quinze foram analisados molecularmente e positivos para *avipox* por PCR. Oito pinguins (SC250, SC271, SC272, SC273, SC 286, SC268, SC290 e ES134) foram eutanasiados, necropsiados e analisados histopatologicamente.

6.2.2 Análise Patológica

Para análise microscópica, as amostras de tecidos, incluindo cérebro, medula óssea, coração, fígado, baço, rim, pâncreas, lesões da pele (quando ainda presente), músculo esquelético, esôfago, proventrículo, ventrículo, intestinos, sacos aéreos, traqueia, pulmões, bursa de Fabricius (quando presente), tiróides, glândula adrenal e testículo/ovário e oviduto foram coletados. Os tecidos foram fixados em solução de formol tamponada 10% e submetidos ao LAPCOM onde foram cortados, embebidos em parafina, seccionados com espessura de 4 μ m e corados com hematoxilina e eosina. Algumas lâminas contendo rim e fígado também foram coradas com PAS (ácido periódico de Schiff), para fins de diagnóstico diferencial e examinadas sob microscopia óptica.

6.2.3 Extração de DNA e amplificação por PCR

As amostras de tecido foram maceradas e aliquotadas conforme descrito no item 3.2.1. O DNA foi extraído conforme descrito no item 3.3.1. A reação de PCR realizada está descrita nos itens 3.5 e 3.5.3 e os *primers* utilizados constam no quadro 1. A metodologia para a análise dos amplicons obtidos está descrita nos itens 3.6 a 3.9.

6.2.4 Clonagem dos amplicons obtidos

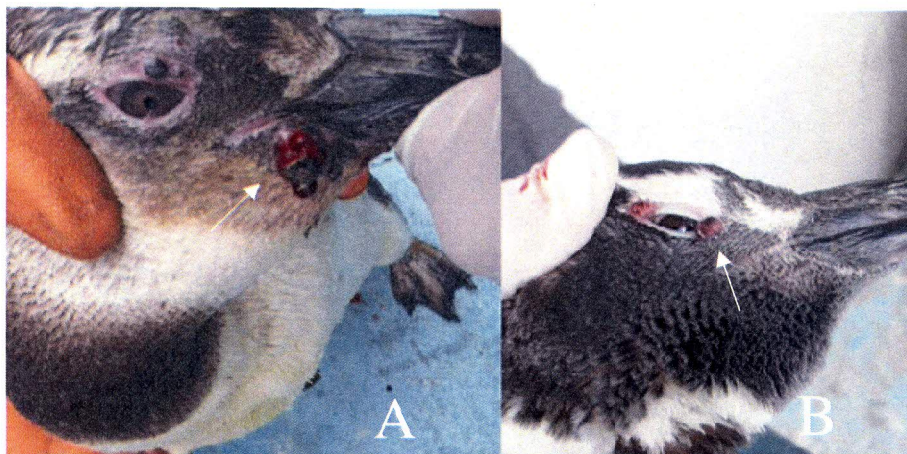
Com o intuito de melhorar a qualidade da sequência genética obtida, fragmentos amplificados foram clonados em plasmídeos. Assim, 10 μ l do produto de PCR foram individualmente inseridos em plasmídeos pTZ57R/T utilizando o kit comercial InsTaclone

©™ (Fermentas, Maryland, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, e os plasmídeos foram então utilizados para transformar *Escherichia coli* JM 109 competentes. Os clones de cada fragmento amplificado foram selecionados e cultivados em meio LB (meio Luria Bertani) por 12 horas à 37°C, sob agitação (150 rpm). A presença dos produtos amplificados inseridos em cada clone foi verificada por PCR utilizando-se *primers* M13/pUC senso e anti-senso, voltados para a região adjacente a inserção do plasmídeo, segundo as instruções do fabricante. As colônias transformadas foram submetidas a extração do plasmídeo utilizando o kit de plasmídeo NucleoSpin ©™ (Macherey Nagel, Düren, Alemanha), conforme a recomendação do fabricante e os plasmídeos foram sequenciados com os *primers* M13/pUC senso e anti-senso de acordo com o protocolo já descrito.

6.3 RESULTADOS

Um dos sete pinguins eutanasiado em Florianópolis apresentava boa condição corporal, já os outros seis apresentavam condição corporal ruim a boa, mesmo sendo alimentados com a mesma quantidade diária de peixes. As lesões cutâneas foram restritas à região das pálpebras e bico (Figura 6.1), variando de pápulas pálidas avermelhadas até nódulos enegrecidos, medindo cerca de 0,2 a 1 cm de diâmetro, com consistência friável e hemorrágica. Macroscopicamente, nenhuma lesão diftérica foi identificada na mucosa de superfície respiratória ou digestória, e todas as aves apresentaram congestão pulmonar difusa leve a severa, leve edema pulmonar, esplenomegalia e cardiomegalia. Um pinguim juvenil apresentou espessamento severo dos sacos aéreos torácicos e abdominais caudais, com presença de exsudato caseoso amarelado recobrimdo seu interior. Sobre os sacos aéreos espessados, visualizou-se nódulos amarelo-esverdeado que variaram de 0,5 a 3 centímetros de diâmetro, distribuídos de forma multifocal na porção cranial dos sacos aéreos; lesões compatíveis com uma aerossaculite micótica severa. Apenas um pinguim de Vila Velha, ES foi eutanasiado e este apresentou cardiomegalia, esplenomegalia e hepatomegalia.

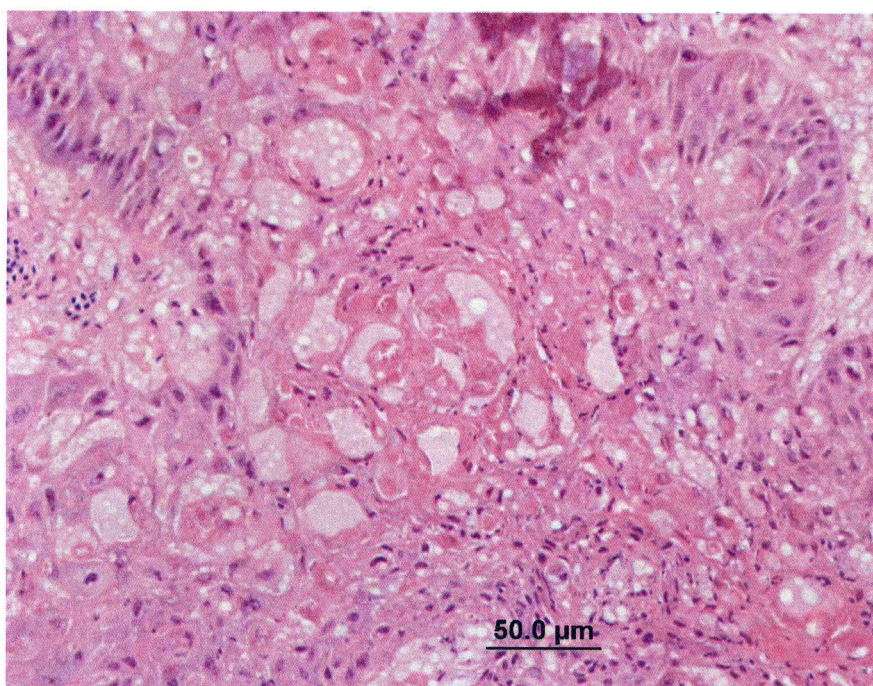
Figura 6.1 - Lesão verrucosa nodular em região de bico e pálpebra (A) do pinguim de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) SC286 oriundo de Santa Catarina e (B) lesão palpebral do genótipo ES134 KC 588962 identificado no Espírito Santo.-Florianópolis e Vitória-2012



Fonte: (NIEMEYER, C. 2012)

A avaliação histológica das lesões cutâneas presentes nas pálpebras e bico revelou hipertrofia acentuada e hiperplasia das células espinhosas da epiderme. Também foram verificadas inclusões eosinofílicas distendendo o citoplasma das células epiteliais com degeneração balonosa e grandes inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas circundadas por um halo claro, consistentes com corpúsculos de Bollinger (Figura 6.2).

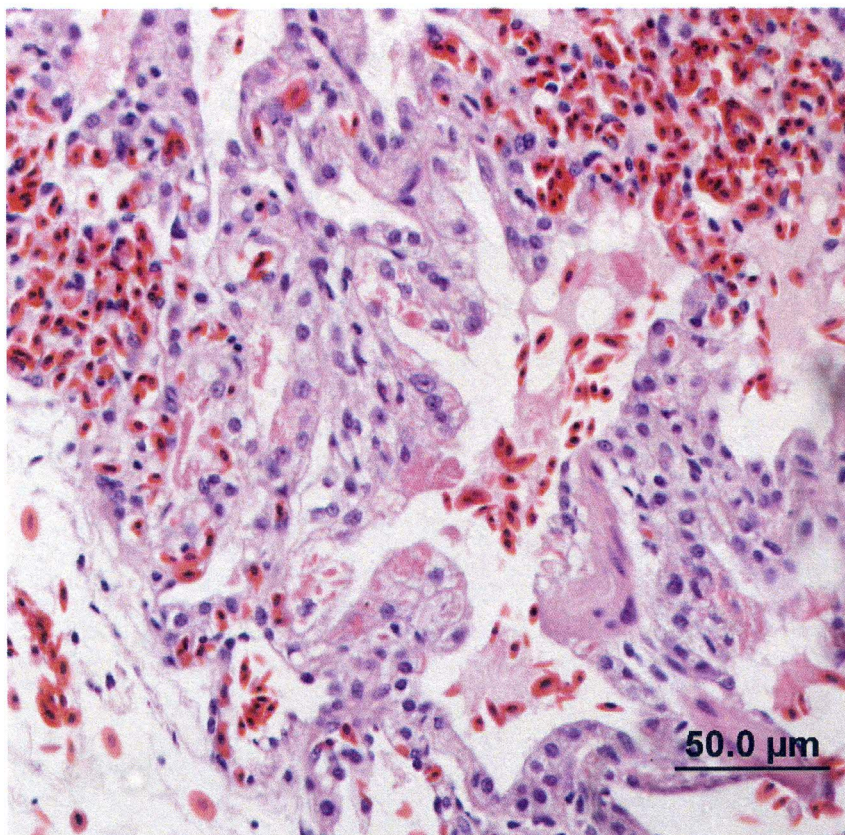
Figura 6.2 - Lesão cutânea em pinguim de Magalhães demonstrando distensão do citoplasma de células epiteliais com degeneração balonosa e presença de grandes inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas envoltas por um halo branco consistentes com Corpúsculos de Bollinger. Hematoxilina e Eosina.-São Paulo-2012



Fonte: (NIEMEYER, C. 2012)

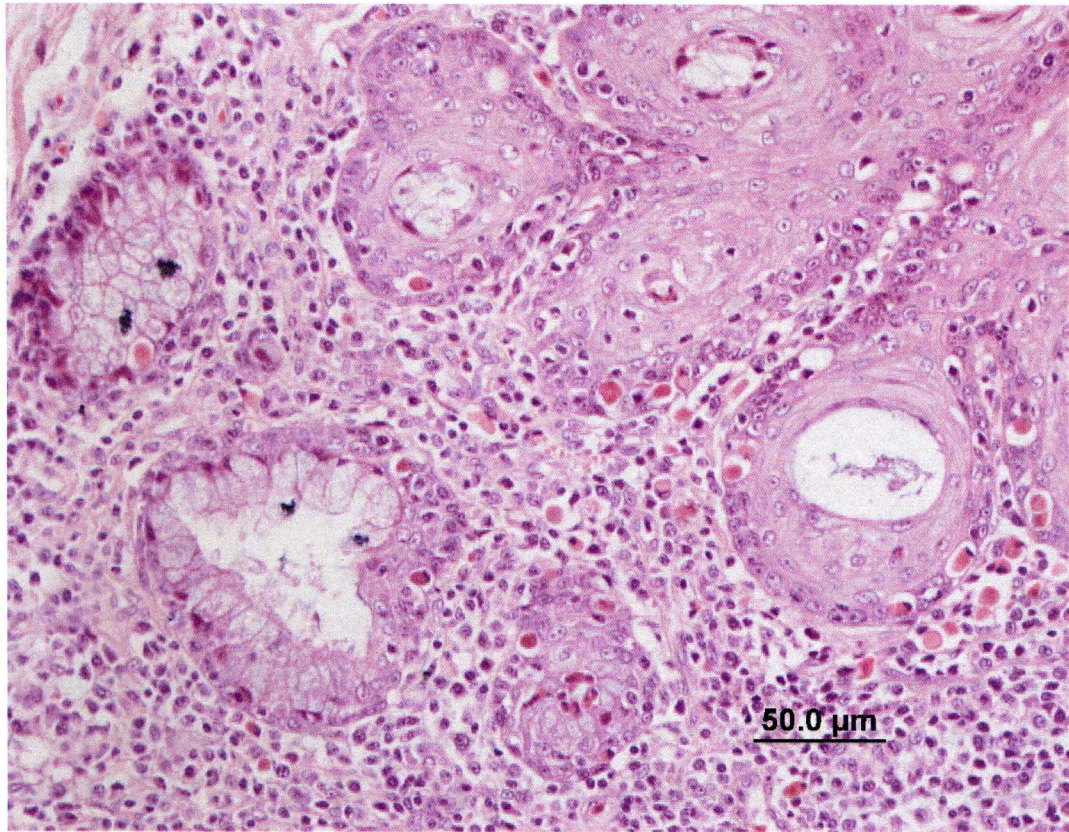
As lesões histopatológicas mais consistentes foram nos pulmões, esôfago, fígado, baço e nos intestinos. Todos os pinguins apresentaram congestão moderada a severa nos pulmonar e hemorragias multifocais a coalescentes. Quatro pinguins apresentaram broncopneumonia subaguda discreta a moderada, com inclusões de Bollinger nas células epiteliais brônquicas (Figura 6.3) e o pinguim juvenil apresentou importante pneumonia piogranulomatosa associada com aerossaculite micótica. Esofagite, variando de difusa, aguda, leve a moderada a necrotizante e ulcerativa, foi visualizada em todos os sete animais necropsiados em Florianópolis. Além disso, cinco pinguins apresentaram inclusões intracitoplasmáticas consistentes com a presença do *Avipox* no epitélio esofágico (Figura 6.4) e três apresentaram micro abscessos epiteliais. No fígado, todos os animais apresentavam infiltrado inflamatório em região periportal, variando entre uma hepatite linfoplasmocítica discreta a moderada, a uma hepatite necrótica, mista severa.

Figura 6.3 - Epitélio bronquiolar de um pinguim de Magalhães apresentando inclusões intracitoplasmáticas eosinofílicas, corpúsculo de Bollinger, e broncopneumonia linfoplasmocítica. H & E.-São Paulo-2012



Fonte: (NIEMEYER, C. 2012)

Figura 6.4 - Epitélio esofágico de um pinguim de Magalhães demonstrando a presença de corpúsculos de inclusão intracitoplasmáticos e eosinofílicos, corpúsculos de Bollinger, e infiltrado linfoplasmocítico devido a infecção pelo *Brazilian penguipox*. H&E.-São Paulo-2012



Fonte: (NIEMEYER, C. 2012)

Todos os pinguins analisados apresentaram inflamação intestinal difusa leve com presença de infiltrado inflamatório misto e hiperplasia do tecido linfóide associado. Duas aves apresentaram abscessos multifocais nas criptas. No baço, todos apresentaram linfocitólise discreta e histiocitose; duas aves apresentaram esplenite necrotizante severa com perda da arquitetura de órgãos. Três pinguins apresentaram hematopoiese extramedular esplênica e hepática.

Fragments of DNA condizente com *Avipox* foram amplificados nas 15 amostras de lesão cutâneas testadas. Após a clonagem dos amplicons, 20 sequências foram obtidas, dentre as quais seis genótipos diferentes foram encontrados em fragmentos de 579bp (Número de acesso no GenBank: KC588956 (SC190 clone 1), KC588955 (SC190clone 2), KC588958 (SC271 clone 1), KC588959 (SC271 clone 3), KF516679 (SC286) e KC588962 (ES134). Estes foram consistentes com o tamanho das sequências de nucleotídeos publicadas

anteriormente para a proteína do capsídeo viral 4b publicadas no GenBank, e a análise das sequências obtidas demonstrou uma identidade de nucleotídeos variando de 91 a 100% entre as estirpes de Florianópolis (SC) e uma identidade variando de 73,2% a 73,6% entre as estirpes de Santa Catarina (SC) e Espírito Santo (ES).

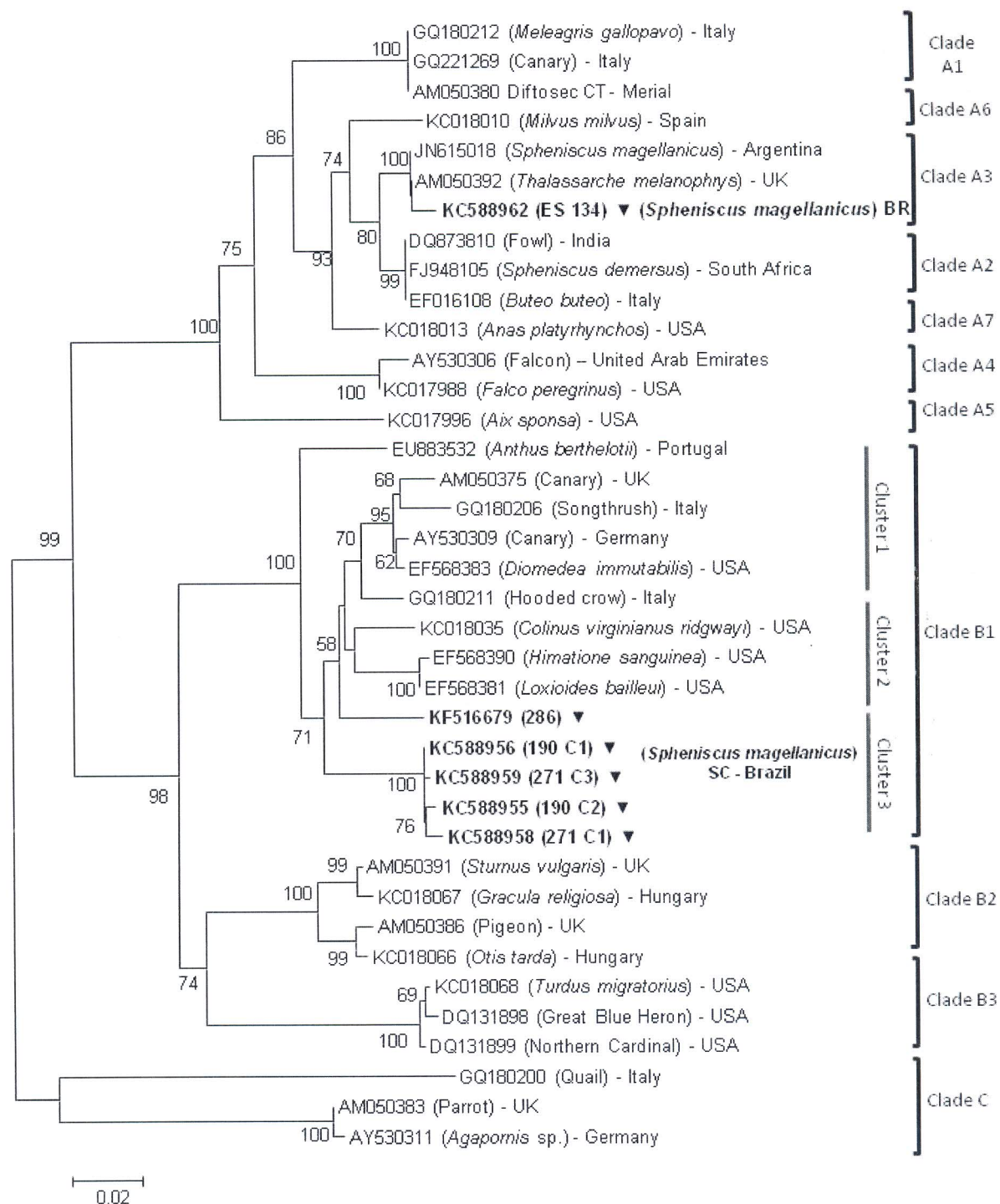
A análise filogenética destes seis genótipos revelou que os mesmos poderiam ser separados em dois grupos distintos. Uma busca na base de dados da NCBI forneceu 93 sequências similares de *Avipoxvirus* descritas. A árvore filogenética demonstrando a divergência entre as amostras das duas áreas geograficamente distintas no Brasil e entre elas e outras 34 sequências descritas na literatura pode ser verificada na figura 6.5.

6.4 DISCUSSÃO

As lesões macroscópicas e microscópicas observadas na pele destes pinguins foram consistentes com a manifestação clínica das enfermidades descritas por *Avipoxvirus* na literatura (HANSEN, 1999; RAMPIN, 2007; VAN RIPER III, 2007; WELI, 2011; KANE, 2012). Todos os pinguins apresentaram severa congestão e hemorragia pulmonar, um achado provavelmente relacionado com a presença de iodeto de mebezônio na solução de eutanásia, que provoca o colapso e paralisia dos músculos respiratórios (HELLEBREKERS, 1990). Uma vez que cinco dos oito pinguins analisados histologicamente apresentaram broncopneumonia linfoplasmocítica difusa e corpúsculos inclusão de Bollinger nas células epiteliais brônquicas, acredita-se que a estirpe viral identificada em Santa Catarina pode ser tão virulenta quanto os *canarypox* causadores de pneumonia identificados e relatados nos canários por Johnson³ e Castro (1986 apud JARMIN et al., 2006).

³ JOHNSON, B. J.; CASTRO, A. E. Canary pox causing high mortality in an aviary. *Journal of American Veterinary Association*, v. 189, p. 1345-1347, 1986.

Figura 6.5 - Árvore filogenética de nucleotídeos contendo fragmentos (578pb) do gene codificante da proteína 4b do capsídeo viral do *Avipoxvirus* construída pelo algoritmo de *Neighbour-joining* e o modelo MCL com 1,000 repetições. As sequências (KC588955 - KC588962) foram identificadas neste estudo e alinhadas com 34 sequências de *Avipoxvirus* disponíveis no Genbank representantes dos 11 diferentes clados (A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, B1, B2, B3 e C) descritos. Amostras sinalizadas com o símbolo ▼ representam as sequências adquiridas em amostras de pinguim (*Spheniscus magellanicus*) coletadas nos estados de Santa Catarina (SC) e Espírito Santo (ES), Brasil. Classificação proposta por Manarolla et al., (2010) e Gyuranecz et al., (2013).



Fonte: (NIEMEYER, C. 2014)

Neste estudo foram identificados seis genótipos diferentes de *Avipoxvirus* com base na identidade da sequência de nucleotídeos. Entre esses seis genótipos, aqueles encontrados em Santa Catarina (KC588955, KC588956, KC588958, KC588959 e KF516679) se apresentaram como estirpes mais virulentas, causando lesões cutâneas e diftéricas no esôfago e do trato respiratório superior dos pinguins de Magalhães. Quatro aves apresentaram infecção por dois genótipos diferentes simultaneamente. A estirpe identificada no Espírito Santo, KC588962, também provocou esofagite com a presença de inclusões de Bollinger no epitélio esofágico, porém não foram observadas lesões em trato respiratório. Tripathy et al. (2000) apontaram a infecção emergente por poxvírus como uma das principais causas responsáveis pelo declínio das populações nativas de aves no Havá e nas Ilhas Canárias. Essa preocupação, juntamente com a falta de conhecimento a respeito das estirpes de poxvírus circulantes na avifauna Atlântica brasileira, basearam a recomendação de eutanásia dos pinguins, ao em vez do tratamento e possível liberação dos mesmos. Os pinguins de Magalhães são aves migratórias que se reproduzem nas regiões da patagônia Argentina, Chilena e nas Ilhas Malvinas (Falklands), e migram rumo ao norte para a plataforma continental brasileiras durante o período do inverno (WILLIAMS, 1995). A liberação de uma ave enferma ou que apresente uma infecção viral latente recém-adquirida, pode ser um perigo para toda a população de pinguins de Magalhães, população está que já apresenta declínio nos últimos 30 anos (BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2012).

Na análise da sequência parcial do gene codificador da proteína 4b, a comparação dos dados aqui apresentados com outras sequências previamente publicadas no GenBank revelou uma similaridade de apenas 76,4% a 77,1% na matrix de identidade dos nucleotídeos entre as linhagens de SC e o *penguinpox* (GenBank FJ948105) descrito em pinguins Africanos (*Spheniscus demersus*) e de 75,7% a 76,4% de similaridade com o *avipoxvirus* já descrito nos pinguins de Magalhães na patagônia Argentina (GenBank JN615018). Curiosamente, a estirpe identificada no Espírito Santo (ES) revelou uma similaridade de 96,7% com o *penguinpox* e 99% com o *avipox* anteriormente descrito nos pinguins de Magalhães por Kane et al. (2012). A árvore filogenética (Figura 6.5) demonstra que a estirpe KC588962 identificada no ES poderia pertencer ao clado A3, de acordo com a classificação proposta por Jarmin et al. (2006) e Manarolla et al. (2010). Com base na filogenia dos *Avipoxvirus*, seu hospedeiro e patogênese distinta, sugere-se que as sequências KC588955, KC588956, KC588958, KC588959 e KF516679, identificadas e descritas neste trabalho, representam uma nova

estirpe de *avipoxvirus* e que poderia ser classificada em um novo cluster ou subclado do clado B.

Surtos de poxvirose podem ser comuns em aviários, centros de reabilitação e outros locais onde as instalações proporcionam um contato próximo entre as aves (HANSEN, 1999; VAN RIPER III, 2007). Além disso, pouco se sabe sobre a variedade de hospedeiros os quais os poxvírus aviários são capazes de infectar, embora geralmente se assume que esta variedade seja limitada (JARMIN, 2006). Kim et al. (2003) identificaram um poxvírus muito virulento causando a forma diftérica da doença em um condor andino (*Vultur gryphus*), e o mesmo, quando inoculado em galinhas, produziu apenas lesões cutâneas localizadas e discretas. Embora a infecção por poxvírus já tenha sido descrita em pinguins de Magalhães por Kane et al. (2012), as estirpes encontradas no centro de reabilitação no Estado de Santa Catarina se mostraram geneticamente muito diferenciadas daquelas descritas na região da patagônia Argentina. Como não existem outras sequências de *avipox* disponíveis no GenBank descritas na avifauna brasileira, não se pode afirmar se essas estirpes de *avipox* indentificadas em SC são de ocorrência original da avifauna local ou se os pinguins já eram portadores e mantinham uma infecção latente, desenvolvendo a doença clínica devido ao stress causado pela contaminação e reabilitação.

O centro de reabilitação em Santa Catarina está localizado dentro de uma área de preservação ambiental onde existem diferentes aves selvagens habitando a região em torno dos recintos. Mesmo com a vigilância constante das equipes de veterinários e biólogos para detectar qualquer sinal de infecção na fauna local e em outras espécies de aves aquáticas em processo de reabilitação, não foram observadas lesões ou outros sinais clínicos de infecção por *Avipoxvirus* evidente, embora a infecção sub-clínica ou inaparente não possa ser descartada. Assim, pode-se especular que os pinguins, como aves pelágicas, podem ser mais suscetíveis aos genótipos de poxvírus aqui descritos do que as outras espécies aviárias. Mais estudos devem ser realizados investigando a ocorrência da doença em outros lugares, demonstrando se esses vírus apresentam maior dispersão ao longo da costa brasileira, se eles podem ser encontrados em outras espécies de aves aquáticas e se a sua transmissão persisti ao longo do tempo.

Mangini et al. (2012) concluíram que as comunidades de aves podem ser utilizadas como sentinelas para a saúde ecológica, e que alterações ambientais podem gerar distúrbios ecológicos e epidemiológicos. Talvez a ocorrência desta infecção por *Avipox* nos pinguins

seja uma questão de saúde local, um *spillover* de um vírus circulante entre as aves florestais; talvez possa ser um sinal de distúrbio ecológico. Considerando-se que a maioria dos pinguins encalharam nas praias brasileiras devido a presença de óleo nas penas, os resultados apresentados neste estudo comprovam que a pesquisa sobre o estado de saúde da fauna selvagem é uma boa maneira de se analisar a saúde do meio ambiente e, assim, o impacto humano sobre a saúde dos ecossistemas.

REFERÊNCIAS

BOLTE, A. L.; MAURER, J.; KALETA, E. F. Avian host spectrum of avipoxviruses. **Avian Pathology**, v. 28, p. 415-432, 1999.

BIRDLIFE INTERNATIONAL. *Spheniscus magellanicus*. In: IUCN 2013. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2013.1. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acessado em: 10 ago. 2013.

CARULEI, O.; DOUGLASS, N.; WILLIAMSON, A. L. Phylogenetic analysis of three genes of Penguinpox virus corresponding to Vaccinia virus G8R (VLTF I), A3L (P4b) and H3L reveals that it is most closely related to Turkeypox virus, Ostrichpox virus and Pigeonpox virus. **Virology Journal**, v. 6, p. 52, 2009.

GYURANECZ, M.; DANC, A.; IPD, H. S.; EGSTADD, K. F.; PARKERE, P. G.; HIGASHIGUCHIE, J. M.; SKINNER, M. A.; HÖFLEG, U.; KREIZINGERA, Z.; DORRESTEINH, G. M.; SOLTI, S.; SÓSI, E.; KIMK, Y. J.; UHART, M.; PEREDA, A.; GONZÁLEZ-HEINN, G.; HIDALGON, H.; BLANCO, J. M.; ERDÉLYC, K. Worldwide phylogenetic relationship of avian poxviruses. **Journal of Virology**, v. 87, n. 9, p. 4938-4951, 2013.

HANSEN, W. Avian Pox Chapter 19. In: FRIEND, M.; FRANSON, C. (Eds.) **Field manual of wildlife diseases: General field procedures and diseases of birds**. Madison:USGS, 1999, p. 163-170.

HELLEBREKERS, L. J.; BAUMANS, V.; BERTENS, A. P. M. G.; HARTMAN, W. On the use of T61 for euthanasia of domestic and laboratory animals; an ethical evaluation. **Laboratory Animals**, v. 24, p. 200-204, 1990.

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**, v. 87, p. 2191-2201, 2006.

KANE, O. J.; UHART, M. M.; RAGO, V.; PEREDA, A. J.; SMITH, J. R.; BUREN, A. V.; CLARK, J. A.; BOERSMA, P. D. Avian pox in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Wildlife Disease**, v. 48, p. 790-794, 2012.

KIM, T. J.; SCHNITZLEIN, W. M.; MCALOOSE, D.; PESSIER, A. P.; TRIPATHY, D. N. Characterization of an avianpox virus isolated from an Andean condor (*Vultur gryphus*). **Veterinary Microbiology**, v. 96, p. 237-246, 2003.

LACHISH, S.; BONSALE, M. B.; LAWSON, B.; CUNNINGHAM, A. A.; SHELDON, B. C. Individual and population-level impacts of an emerging poxvirus disease in a wild population of Great Tits. **PLoS ONE**, v. 7, e48545, 2012.

LAWSON, B.; LACHISH, S.; COLVILE, K. M.; DURRANT, C.; PECK, K. M. Emergence of a novel avian pox disease in British Tit Species. **PLoS ONE**, v. 7, e40176, 2012.

LEE, L. H.; LEE, K. H. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 113-119, 1997.

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

MANGINI, P. R.; JORGE, R. S. P.; SANTOS, M. R.D., FILONI, C.; VERONA, C. E. S.; NAVA, A.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J. C. R. Conservation medicine in Brazil. In: AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; DASZAK, P. (Eds.) **New directions in conservation medicine**. New York: Oxford University Press, 2012, p. 466-478.

RAMPIN, T.; PISONI, G.; MANAROLLA, G.; GALLAZZI, D.; SIRONI, G. Epornitic of avian pox in common buzzards (*Buteo buteo*): virus isolation and molecular biological characterization. **Avian Pathology**, v. 36, p. 161-165, 2007.

STANNARD, L. M.; MARAIS, D.; KOW, D.; DUMBELL, K. R. Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1637-1646, 1998.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731-2739, 2011.

TRIPARTHY, D. N.; SCHNITZLEIN, W. M.; MORRIS, P. J.; JANSSEN, D. L.; ZUBA, J. K.; MASSEY, G.; ATKINSON, C. T. Characterization of poxviruses from forest birds in Hawaii. **Journal of Wildlife Disease**, v. 36, p. 225-230, 2000.

VAN RIPER III, C.; FORRESTER, D.J. Avian Pox - Chapter 6. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. (Eds.) **Infectious diseases of wild birds**. Ames, USA: Blackwell Publishing, 2007. p. 131-176.

WELI, S. C.; TRYLAND, M. Avipoxviruses: infection biology and their use as vaccine vectors. **Virology Journal**, v. 8, p. 49, 2011.

WILLIAMS, T. D. **The Penguins: spheniscidae**. Oxford, UK: Oxford University Press, 1995.

7 CORONAVÍRUS AVIÁRIO EM AVES MARINHAS NOS CENTROS DE REABILITAÇÃO DA REGIÃO SUL DO BRASIL

7.1 INTRODUÇÃO

Os coronavírus podem causar diferentes enfermidades em aves e mamíferos, inclusive nos seres humanos. Nas aves, a principal enfermidade descrita é a bronquite infecciosa aviária (BIA), um processo agudo, altamente contagioso, causado por um *Gammacoronavirus*. Esta doença provoca anualmente importantes perdas econômicas na indústria avícola brasileira e mundial (CHU, 2011; DOMANSKA-BLICHAZ, 2014). Os *Gammacoronavirus* podem causar alterações respiratórias, renais, gastroentéricas e reprodutivas em galinhas de todas as idades, e ao se replicarem no oviduto, causam redução na qualidade e na quantidade de ovos gerados por matrizes e aves de postura. Por apresentar uma alta taxa de mutação e recombinação, o vírus frequentemente gera novas variantes, o que dificulta seu controle e facilita a disseminação e ocorrência em diferentes áreas geográficas (HUGHES, 2009; REVOLLEDO, 2009; DOMANSKA-BLICHAZ, 2014).

Nos últimos anos, diversos trabalhos têm sido realizados mundialmente na busca e identificação de coronavírus aviários nas aves silvestres, sejam mantidas em cativeiro ou de vida livre. Nestes trabalhos já foram identificadas diferentes variantes de coronavírus em Galliformes, Charadriiformes, Anseriformes, Columbiformes, Passeriformes, Pelecaniformes, Ciconiiformes e Psittaciformes (CAVANAGH, 2005; JONASSEN, 2005; GOUGH, 2006; QIAN, 2006; WOO, 2009; CHEN, 2010, 2013; CHU, 2011; DOMANSKA-BLICHAZ, 2014). Estes trabalhos, além de identificarem diversidade genética entre os coronavírus em aves de vida livre, contribuíram com a hipótese de que estas aves selvagens possam servir tanto de reservatório natural para o vírus, quanto serem carreadoras e possíveis transmissoras do patógeno, influenciando, em muito, na epidemiologia do mesmo (CHU, 2011; DOMANSKA-BLICHAZ, 2014). O presente trabalho objetivou investigar a ocorrência de *Gammacoronavirus* nas aves marinhas presentes em centros de reabilitação da região Sul da costa brasileira.

7.2 MATERIAS E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de 161 aves marinhas sendo: dois petreus gigantes (*Macronectes giganteus*), quatro atobás marrons (*Sula leucogaster*), um trinta-reis (*Sterna hirundinacea*) e 154 pinguins de Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) em reabilitação nas instituições R3 Animal e CRAM conforme descrito no item 3.1.3.

Dentre as amostras de pinguins, 70 eram fragmentos de rim de aves que vieram a óbito durante o processo de reabilitação. Todas as outras amostras eram *swabs* cloacais que foram coletados, armazenados e processados conforme descrito no item 3.2.1. O RNA foi extraído segundo protocolo descrito no item 3.4 e a hemi-nested PCR realizada está descrita no item 3.5.2. As análises moleculares posteriores estão descritas nos itens 3.6 a 3.9.

7.3 RESULTADOS

Dentre as amostras analisadas, 14.2% (10/70) dos macerados de rim e 14.2% (12/84) dos *swabs* de cloaca dos pinguins de Magalhães, 50% (2/4) dos *swabs* cloacais de atobá marrom e 50% (1/2) dos *swab* cloacais de petrel gigante foram positivos na hemi nested-PCR para a região 3' não codificante (3'UTR) do coronavírus aviário. Foram geradas 10 sequências genéticas, as quais foram submetidas ao Genbank e 4 delas denominadas JX013533, JX013534, JX013535, JX013536, enquanto as demais ainda aguardam denominação.

A análise filogenética se baseou nas sequências finais de 136pb, sem as sequências correspondentes aos *primers*. A matriz de identidade revelou uma similaridade de 98 a 100% dentre as sequências identificadas neste estudo. As sequências das amostras de aves marinhas apresentaram uma similaridade que variou de 97.6 a 99.2% em comparação com a variante H120 e 98.4 a 100% de similaridade com a variante M41, ambas sendo as principais variantes vacinais (Massachusetts) utilizadas nas aves de produção no Brasil. Comparando as sequências obtidas com sequências homólogas e também detectadas em amostras de aves aquáticas adquiridas no Genbank, verificou-se similaridade de 96.1 a 97.6% com o coronavírus identificado em cisnes (*Cygnus cygnus*) na Inglaterra (FJ490193), 97.6 a 99.2% de similaridade com o coronavírus (GU323505) identificado em pinguim rei (*Aptenodytes*

patagonicus) no Parque Zoológico Municipal de Bauru, São Paulo, Brasil (CARDOSO, 2011) e 43% de similaridade com o coronavírus (KJ690966) identificado em patos (*Anas sp*) na Polônia. Todas as sequências identificadas neste trabalho, e a maioria das sequências 3'UTR identificadas em aves aquáticas,

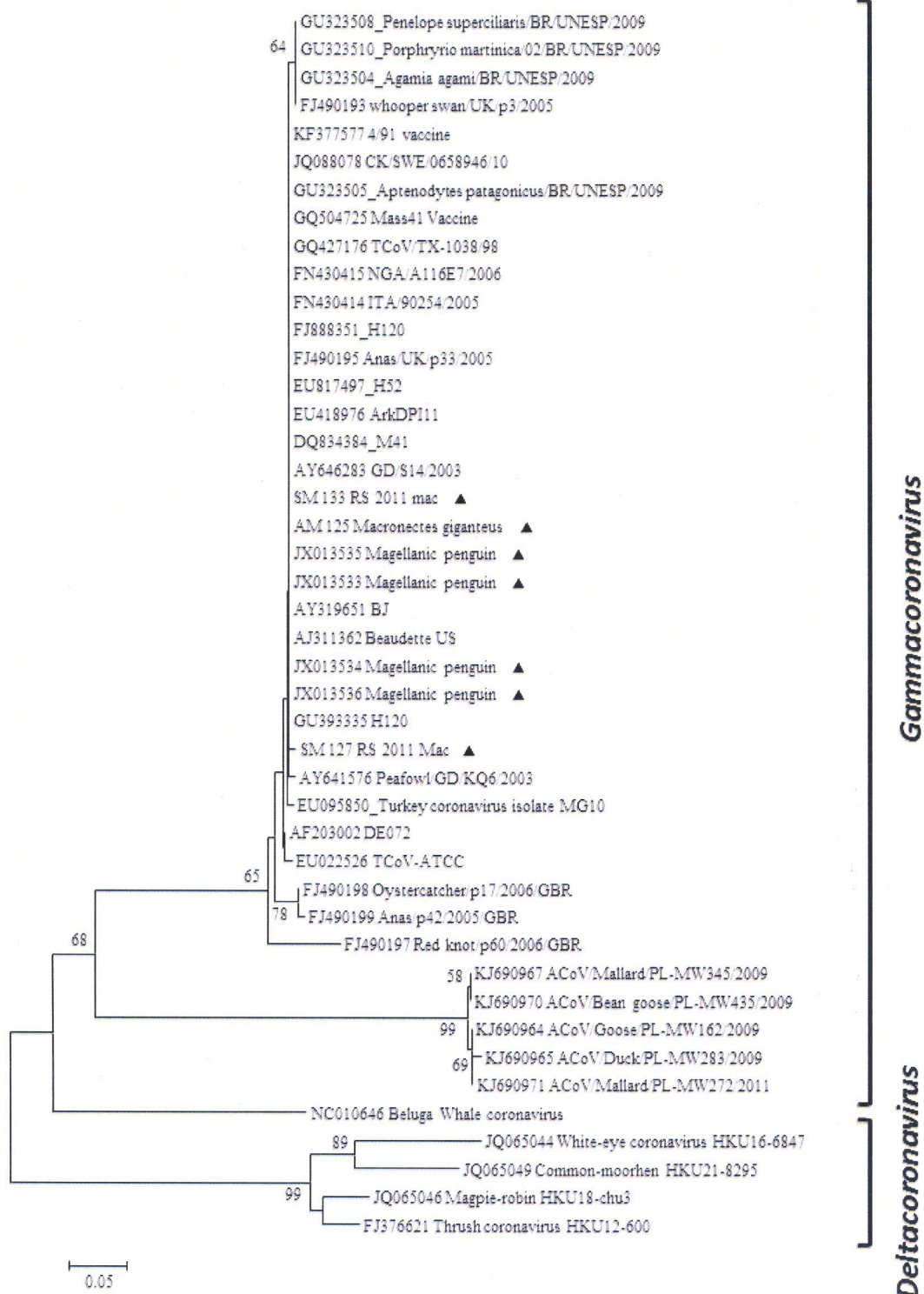
formaram um *cluster* relativamente homogêneo, que inclui as linhagens de *Gammacoronavirus* descritas em aves, suportado por um valor de *bootstrap* de 68. A linhagem SW1 de coronavírus de beluga, também pertencente ao gênero *Gammacoronavirus*, apresentou segregação independente entre o cluster de *Gammacoronavirus* das aves e o cluster dos *Deltacoronavirus*, o que pode ser visualizado na árvore filogenética representada na figura 7.1.

7.4 DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Foi identificado pela primeira vez a ocorrência de coronavírus em aves marinhas recém adentradas em reabilitação ou que faleceram durante o processo de reabilitação na costa brasileira. Também, até onde se sabe, este é o primeiro relato de coronavírus aviário em Procelariiformes. Cardoso et al. (2011) relataram a ocorrência assintomática de coronavírus em um exemplar de pinguim rei (*Sphenisciformes*) em cativeiro no Zoológico de Bauru, São Paulo, porém este é o primeiro relato de ocorrência do vírus em pinguins de Magalhães. A frequência de ocorrência de 14.2% entre os pinguins de Magalhães condiz com os 13% encontrados por Chu et al. (2011) entre a população de garças chinesas de vida livre (*Ardeola bacchus/speciosa*) no Camboja. Já a alta ocorrência de 50% identificada entre os petréis e atobás pode ser explicada pelo baixo número amostral analisado, sendo dois e quatro respectivamente.

Por mais que as amostras sejam de aves em reabilitação, nenhuma delas apresentava sinais clínicos compatíveis com BIA, sendo que a grande maioria delas foi resgatada por apresentarem graus diversos de petrolização. Contudo, não se pode descartar a hipótese de que a presença do coronavírus tenha influenciado o estado clínico geral das aves, principalmente frente a fatores imunossupressores como a contaminação por petróleo.

Figura 7.1 - Análise filogenética dos fragmentos de 136pb da região 3'UTR não codificante de coronavírus aviários identificados em pinguins de Magalhães e petrel gigante em centros de reabilitação no Brasil (identificados com o símbolo ▲). A árvore, gerada pelo método de Neighbour-joining com 1000 repetições de bootstraps, contém outras 37 sequências disponíveis no Genbank que representam amostras dos gêneros *Gammacoronavirus* e *Deltacoronavirus*



Fonte: (NIEMEYER, C. 2014)

A análise filogenética demonstrou uma baixa diversidade entre as amostras deste estudo, mesmo comparando as amostras de aves encontradas e reabilitadas no litoral de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Esta alta similaridade entre os vírus encontrados nos pinguins sugere que os mesmos não tenham se infectado nos centros de reabilitação, e sim que sejam hospedeiros naturais da variante viral encontrada. Entretanto, uma vez que o fragmento

analisado é pequeno e de uma região genômica não codificante e pouco variável, recomenda-se que estudos futuros sequenciem e analisem outras regiões genômicas para que se possa compreender melhor a epidemiologia dos coronavírus nestas aves.

Muitos dos coronavírus encontrados em aves selvagens de vida livre apresentam alta similaridade tanto com as variantes vacinais utilizadas mundialmente, quanto com variantes isoladas em aves comerciais (HUGHES, 2009). Segundo Cavanagh (2005), o vírus causador da BIA pode, aparentemente, se replicar não apenas em galinhas mas também em marrecos e em outras aves, além dos Galiformes. Hughes et al. (2009) afirmam que as aves selvagens são capazes de transmitir e disseminar diferentes coronavírus aviários mesmo quando assintomáticas. Esses estudos demonstram a importância do monitoramento constante da ocorrência de coronavírus aviário em aves migratórias que utilizam regiões do território brasileiro como zonas de alimentação e/ou descanso, uma vez que estas podem ser carreadoras de diferentes variantes virais capazes de infectar aves comerciais.

A identificação de coronavírus em aves marinhas recém chegadas aos centros de reabilitação justifica também o monitoramento do estado de saúde desse grupo de aves. Uma vez que existem variantes virais cuja patogenia está relacionada principalmente ao oviduto e a produção de ovos, a presença do vírus nas populações pode interferir negativamente no sucesso reprodutivos dessas aves, principalmente as que sofrem constantes desafios imunológicos relacionados a alteração e contaminação ambiental. Assim, sugere-se que mais estudos epidemiológicos identificando a ocorrência de coronavírus sejam realizados, principalmente nas colônias reprodutivas de aves marinhas ao longo da costa brasileira.

REFERÊNCIAS

- CARDOSO, T. C.; TEIXEIRA, M. C. B.; GOMES, D. E.; JEREZ, A. J. Genetically diverse coronaviruses in captive Bird populations in a brazilian zoological park. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 2, p. 165-168, 2011.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. **Avian Pathology**, v. 34, p. 439-448, 2005.
- CHEN, Q.; LI, J.; DENG, Z.; XIONG, W.; WANG, Q.; HU, Y. Q. Comprehensive detection and identification of seven animal corona- viruses and human respiratory coronavirus 229E with a microarray hybridization assay. **Intervirolgy**, v. 53, p. 95-104, 2010.
- CHEN, G. Q.; ZHUANG, Q. Y.; WANG, K. C.; LIU, S.; SHAO, J. Z.; JIANHG, W. M.; HOU, G. Y.; LI, J. P.; YU, J. M.; LI, Y. P.; CHEN, J. M. Identification and survey of a novel avian coronavirus in ducks. **PLoS One**, v. 8, e72918, 2013.
- CHU, D. K. W.; LEUNG, C. Y. H.; GILBERT, M.; JOYNER, P. H.; NG, E. M.; TSE, T. M.; GUAN. Y.; PEIRIS, J. S. M.; POON, L. L. M. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12815-12820, 2011.
- DOMANSKA-BLICHARZ, K.; JACUKOWICZ, A.; LISOWSKA, A.; WYROSTEK, K.; MINTA, Z. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis-like viruses I wild birds population. *Avian Pathology*, DOI: 10.1080/03079457.2014.949619, 2014.
- GOUGH, R. E.; DRURY, S. E.; CULVER, F.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Isolation of a coronavirus from a green-cheeked Amazon parrot (*Amazon viridigenalis* Cassin). **Avian Pathology**, v. 35, p. 122-126, 2006.
- HUGHES, L. A.; SAVAGE, C.; NAYLOR, C.; BANNETT, M.; CHANTREY, J.; JONES, R. Genetically diverse coronaviruses in wild birds populations of northern England. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1091-1094, 2009.
- JONASSEN, C. M.; KOFSTAD, T.; LARSEN, I. L.; LOVLAND, A.; HANDELAND, K.; FOLLESTAD, A.; LILLEHAUG, A. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columba livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). **Journal of General Virology**, v. 86, p. 1597-1607, 2005.
- QIAN, D. H.; ZHU, G. J.; WU, L. Z.; HUA, G. X. Isolation and characterization of a coronavirus from pigeons with pancreatitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 67, p. 1575-1579, 2006.
- REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia aviária**. Barueri: Editora Manole, 2009. 510 p.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; LAM, C. S. F.; LAI, K. K. Y.; HUANG, Y.; LEE, P.; LUK, G.; DYRTING, K.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. **Journal of Virology**, v. 83, p. 908-917, 2009.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento na incidência de surtos com mortalidade nas populações de aves aquáticas tem sido mundialmente reportado. Em muitos casos, a causa da mortalidade pode ser associada tanto às doenças infecciosas quanto à poluição ambiental aguda ou crônica (NEWMAN, 2007). Ao longo do presente trabalho foram descritos dois surtos de etiologia viral ocasionando mortalidade e morbidade em pinguins de Magalhães mantidos em centros de reabilitação na costa brasileira, sendo um relacionado a um *Herpesvirus* no CRAM - RS, como relatado no item 4, e outro relacionado à presença de *Avipox* na R3 Animal - SC, como relatado no item 6. Em ambos casos, as aves foram resgatadas das praias por apresentarem índices variados de contaminação por petróleo nas penas, mesmo com ausência de qualquer vazamento anunciado na costa brasileira nos anos de 2011 e 2012, respectivamente.

Segundo Mallory et al. (2010), a presença de contaminantes no organismo pode estar associada a uma maior infecção/infestação parasitária e/ou uma redução na função do sistema imune. Esta redução pode ter sido o fator responsável pela ocorrência do surto de herpesvírus; um vírus que sabidamente pode se manter em estado de latência por longos períodos no organismo animal (KALETA, 2007). Segundo Newman et al. (2007), doenças que tenham sua incidência ou impacto recentemente aumentados ou que tenham sido transmitidas para uma nova espécie hospedeira ou para nova área geográfica são determinadas “doenças emergentes”. Desta forma, uma vez que o *Magellanic penguin herpesvirus 2* identificado em aves aparentemente saudáveis e reprodutivamente ativas nas colônias da patagônia Argentina foi geneticamente distinto do vírus causador do surto na costa brasileira, as hipóteses de que o *Magellanic penguin herpesvirus 1* seja uma doença emergente e que as aves possam ter se infectado tanto no percurso migratório, quanto em algum momento entre o resgate e a reabilitação, não podem ser descartadas.

Também, a ocorrência de infecção pelo *Brazilian penguinpox*, uma estirpe geneticamente próxima ao *canarypox*, nos pinguins ao serem reabilitados em um centro localizado em meio a uma reserva florestal e no mesmo ambiente onde são hospedadas aves apreendidas oriundas do tráfico animal de quase todo o estado de Santa Catarina, corrobora com a hipótese de um possível *spillover* entre os Passeriformes e os Spheniciformes reabilitados no local.

Ao longo dos três anos de coleta e recebimento de amostras de aves marinhas da costa atlântica da América do Sul foram identificados também três diferentes genótipos de *Herpesvirus*, assim como o primeiro relato de ocorrência deste vírus em cinco diferentes espécies de aves marinhas. A presença de infecção viral nessas aves justifica o monitoramento, tanto das populações de aves residentes quanto das migratórias, uma vez que alterações na saúde do ecossistema marinho onde esses animais estão inseridos pode predispor a ocorrência de surtos.

A identificação da ocorrência de *Coronavirus* aviário em três diferentes espécies aviárias assintomáticas sugere que estudos de longo prazo sejam realizados, principalmente nas colônias reprodutivas dessas aves, uma vez que a presença deste vírus na população pode causar um declínio populacional e ameaçar a diversidade de espécies em um determinado local (NEWMAN, 2007; MALLORY, 2010).

As identificações do herpesvírus, avipoxvírus e coronavírus nas espécies de aves marinhas estudadas viabilizaram registros até então desconhecidos na costa atlântica da América do Sul. Cremos que os dados aqui apresentados constituem uma base útil de informações para estudos futuros nos campos da patologia, virologia, epidemiologia e dos impactos antrópicos na saúde das aves marinhas do cone sul.

REFERÊNCIAS

- AGUIRRE, A. A.; OSTFELD, R. S.; DASZAK, P. **New Directions in Conservation Medicine: Applied cases of ecological health**. Nova Iorque: Oxford University Press, 2012. 618p.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALVES, V. S.; SOARES, A. B. A.; COUTO, G. S.; EFE, M. A.; RIBEIRO, A. B. B. Aves marinhas de Abrolhos-Bahia, Brasil. In: BRANCO, J. O. **Aves marinhas e insulares brasileiras**. Itajaí: Univali Editora, 2004. cap 10, p. 213-232.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL 2012. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. Disponível em <www.iucnredlist.org>. Acesso em: (22 de september de 2014).
- BIRDLIFE INTERNATIONAL 2013. *Phaeton aethereus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 26 de setembro de 2014.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL 2014. Species factsheet: *Sula dactylatra*. Disponível em <<http://www.birdlife.org>> Acesso em: 26 de setembro de 2014.
- BOERSMA, P. D. Penguins as marine sentinels. **BioScience**, v. 58, n. 7, p. 597-606, 2008.
- BOERSMA, P. D.; REDSTOCK, G. A. Climate change increases reproductive failure in magellanic penguins. **Plos One**, v. 9, n. 1, 2014.
- BOLTE, A. L.; MAURER, J.; KALETA, E. F. Avian host spectrum of 288 avipoxviruses. **Avian Pathology**, v. 28, p. 415-432, 1999.
- BRANCO, J. O. (org.) **Aves marinhas e insulares brasileiras: biotecnologia e conservação**. Itajaí: Univali Editora, 2004. 266 p.
- BRANCO, J. O.; BARBIERI, E.; FRACASSO, H. A. A. Técnicas de pesquisa em aves marinhas. In: STRAUBE, F. C.; PIACENTINI, V. Q.; ACCORDI, I. A.; CÂNDIDO, J. F. **Ornitologia e Conservação: Ciência Aplicada, Técnicas de Pesquisa e Levantamento**. [S.I.]: Techical Books Editora, 2010, p. 219- 235.
- CARDOSO, L. G.; BUGONI, L.; MANCINI, P. L.; HAIMOVICI, M. Gillnet fisheries as a major mortality factor of magellanic penguins in wintering areas. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 840-844, 2011.
- CARULEI, O.; DOUGLASS, N.; WILLIAMSON, A. L. Phylogenetic analysis of three genes of Penguinpox virus corresponding to Vaccinia virus G8R (VLTF-1), A3L (P4b) and H3L reveals that it is most closely related to Turkeypox virus, Ostrichpox virus and Pigeonpox virus. **Virology Journal**, v. 6, n. 52, 2009.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; WELCHMAN, D. B.; BRITTON, P.; GOUGH, R. E. Coronaviruses from pheasants (*Phasianus colchicus*) are genetically closely related to Coronaviruses of domestic fowl (Infectious Bronchitis Virus) and turkeys. **Avian Pathology**, v. 31, n. 1, p. 81-93. 2002.

CAVANAGH, D.; GELB JR. J. Infectious Bronchitis. In: SAIF, Y. M. **Diseases of Poultry**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. Cap 4, p. 117-131.

CHACON, J. L.; FERREIRA, A.J.P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. **Journal of Virological Methods**, v. 151, p. 188-193, 2008.

CHU, D. K. W.; LEUNG, C. Y. H.; GILBERT, M.; JOYNER, P. H.; NG, E. M.; TSE, T. M.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. S. M.; POON, L. L. M. Avian coronavirus in wild aquatic birds. **Journal of Virology**, v. 85, n. 23, p. 12815-12820, 2011.

CRANFIELD, M. R. Sphenisciformes (Penguins) In: FOWLER, M. E.; MILLER, R. E. **Zoo and wild animal medicine**. 5th ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2003. Cap 11, p. 103-110.

COELHO, E. P.; ALVES, V. S.; SONEGHET, M. L. L.; CARVALHO, F. S. Levantamento de aves marinhas no percurso Rio de Janeiro-Bahia (Brasil). **Boletim do Instituto Oceanográfico de São Paulo**, v. 38, n. 2, p. 161-167, 1990.

COLABUONO, F. I. Poluentes orgânicos persistentes e ingestão de plásticos em albatrozes e petréis (Procellariiformes). 2011. Tese (Doutorado em Ciências)-Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS. (CBRO). **Listas das aves do Brasil**. 10. ed. 2011. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 14 set. 2012.

CONSERVAÇÃO INTERNACIONAL BRASIL-CI-BRASIL 2003. **Ecosistemas Marinhos**. 2003. Disponível em <<http://www.conservation.org.br/onde/ecossistemas/index.php?id=204>>. Acesso em: 29 set. 2014.

DAVISON, A. J. Herpesvirus systematics. **Veterinary Microbiology**, v. 143, p. 52-69, 2010.

EFE, M. A.; OLIVEIRA, A. C.; KANEGAE, M. F.; ALVES, V. S. ROSARIO, L. A.; SCHERER NETO, p. Análise dos dados de recuperação de *Sula* spp. (Pelecaniformes, Sulidae) ocorridas no Brasil entre 1981 e 2000. **Ornitologia**, v. n.2, p. 125-133, 2006.

ELLIS, S.; CROXALL, J. P.; COOPER, J. Penguin conservation assessment and management plan: report from the workshop held 8-9 September 1996, Cape Town, South Africa. **IUCN/SSC**, Apple Valley, USA, 1998.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; REYES, L.; REDSTOCK, G. A.; GRIOT, K.; HEREDIA, S. R.; ADORNES, A. C.; SILVA, R. P.

Chronic oil pollution harms Magellanic penguins in the southwest Atlantic. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p. 193-198, 2006.

GARCÍA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, P. D.; RUOPPOLO, V.; PINHO-DA-SILVA-FILHO, R.; CORRADO-ADORNES, A.; CONTE-SENA, D.; VELOZO, R.; MYIAJI-KOLESNIKOVAS, C.; DUTRA, G.; MARACINI, P.; CARVALHO-DO-NASCIMENTO, C.; RAMOS-JUNIOR, V.; BARBOSA, L.; SERRA, S. Magellanic penguin mortality in 2008 along the SW Atlantic coast. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, n. 10, p. 1652-1657, 2010.

HALPERN, B. S.; LONGO, C.; HARDY, D.; MCLEOD, K. L.; SAMHOURI, J. F.; KATONA, S. K.; KLEISNER, K.; LESTER, S. E.; O'LEARY, J.; RANELLETTI, M.; ROSENBERG, A. A.; SCARBOROUGH, C.; SELIG, E. R.; BEST, B. D.; BRUMBAUGH, D. R.; CHAPIN, F. S.; CROWDER, L. B.; DALY, K. L.; DONEY, S. C.; ELFES, C.; FOGARTY, M. J.; GAINES, S. D.; JACOBSEN, K. I.; KARRER, L. B.; LESLIE, H. M.; NEELEY, E.; PAULY, D.; POLASKY, S.; RIS, B.; ST MARTIN, K.; STONE, G. S.; SUMAILA, U. R.; ZELLER, D. An index to assess the health and benefits of the global ocean. **Nature**, v. 488, p. 615-621, 2012.

HOWARD, L. **Sulidae**: animal diversity web. 2003. Disponível em: <<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Sulidae>> Acesso em: 25 set. 2014.

ICTV. Virus Taxonomy: 2013 Release. 2013. Disponível em: <ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> Acesso em: 25 set. 2014.

IUCN RED LIST OF THREATNED SPECIES. Version 2014.2. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 25 set. 2014.

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**, v. 87, n. 310, p. 2191-2201, 2006.

KALETA, E. F.; DOCHERTY, D. E. Avian Herpesvirus In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious diseases of wild birds**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. p. 63-86.

KEESING, F.; BELDEN, L. K.; DASZAK, P.; DOBSON, A.; HARVELL, C. D.; HOLT, R. D.; HUDSON, P.; JOLLES, A.; JONES, K. E.; MITCHELL, C. E.; MYERS, S. S.; BOGICH, T.; OSTFELD, R. S. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, p. 647-652, 2010.

KNOWLTON, N. Ocean health and human health. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 5, p. A 262, 2004.

LEE, L. H.; LEE, K. H. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. **Journal of Virological Methods**, v. 63, p. 113-119, 1997.

LIAIS, E.; CROVILLE, G.; MARIETTE, J.; DELVERDIER, M.; LUCAS, M-N.; KLOPP, C.; LLUCH, J.; DONNADIEU, C.; GUY, J. S.; CORRAND, L.; DUCATEZ, M.

- F.; GUERIN, J-L. Novel avian coronavirus and fulminating disease in guinea fowl, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 1, p. 105-108, 2014.
- MALLORY, M. L.; ROBINSON, S. A.; HEBERT, C. E.; FORBES, M. R. Seabirds as indicators of aquatic ecosystem conditions: A case for gathering multiple proxies of seabirds health. **Marine Pollution Bulletin**, v. 60, p. 7-20, 2010.
- MANGINI, P. R.; SILVA, J.C.R. Medicina da conservação: aspectos gerais. In: CUBAS, Z. S. C.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens medicina veterinária**. São Paulo: Roca, 2006.
- NEVES, T.; OLMOS, F.; PEPPE, F.; MOHR, L. V. **Plano de ação nacional para conservação de albatrozes e petréis**. Brasília: Ibama, 2006. 124 p.
- NEWMAN, S. H.; CHMURA, A.; CONVERSE, K.; KILPATRICK, A. M.; PATEL, N.; LAMMERS, E.; DASZAK, P. Aquatic bird disease and mortality as an indicator of changing ecosystem health. **Marine Ecology Progress Series**, v. 352, p. 299-309, 2007
- OLMOS, F. Thalassarche chlororhynchus (Gmelin 1789). In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2008. v. 2, p. 396-397.
- O POVO Online. **Pinguim encontrado por pescadores é resgatado no litoral cearense**. **O Povo**, Fortaleza, 10 de agosto de 2011. Disponível em: <<http://www.opovo.com.br/app/fortaleza/2011/08/10/noticiafortaleza,2277974/pinguim-encontrado-por-pescadores-e-resgatado-no-litoral-cearense.shtml>> Acesso em: 08 out. 2014.
- PETRY, M. V.; SCHERER, J. F. M.; SCHERER, A. L. Ocorrência, alimentação e impactos antrópicos de aves marinhas nas praias do litoral do rio Grande do Sul, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 20, n.1, p. 65-70, 2012.
- PIATT, J. F.; SYDEMAN, W. J.; WISES, F. Introduction: a modern role for seabirds as indicators. **Marine Ecology Progress**, v. 352, p. 199-204, 2007.
- REVOLLEDO, L.; FERREIRA, A. J. P. **Patologia aviária**. Barueri: Editora Manole, 2009. 504 p.
- RITCHIE, B. W.; CARTER, K. **Avian viruses: function and control**. Lake Worth: Wingers Publishing, 1995. 525 p.
- SICK, H. **Ornitologia Brasileira**. 3. ed. Rio de Janeiro: Editora Nova Fronteira, 2001. 910 p.
- STANNARD, L. M.; MARAIS, D.; KOW, D.; DUMBELL, K. R. Evidence for incomplete replication of a penguin poxvirus in cells of mammalian origin. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 1637-1646, 1998.
- STOKES, D. L.; BOERSMA, P. D. Satellite tracking of Magellanic penguin migration. **The Condor**, v. 100, p. 376-381, 1998.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TICKELL, W. L. N. **Albatrosses**. London: Yale University Press, 2000. 438 p.

TRIPATHY, D. N.; REED, W. M. Pox. In: SAIF, Y. M. **Diseases of poultry**. Oxford: Blackwell Publishing, 2008. Cap 10, p. 291–307.

VAN DEVANTER, D. R.; WARRENER, P.; BENNETT, L.; SCHULTZ, E. R.; COULTER, S.; GARBER, R. L.; ROSE, T. M. Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primers PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 7, p. 1666-1671, 1996.

VAN RIPER III, C.; FORRESTER, D. J. Avian Pox. In: THOMAS, N. J.; HUNTER, D. B.; ATKINSON, C. T. **Infectious diseases of wild birds**. Oxford: Blackwell Publishing, 2007. Cap 6, p. 131–176.