

# BUSCA VIRAL EM AVES SILVESTRES DO BOSQUE DOS JEQUITIBÁS EM CAMPINAS-SP



XXXI Congresso de  
Iniciação Científica  
Unicamp

2023



Palavras-Chave: PARAMYXOVIROIDAE, INFLUENZA, CORONAVIRIDAE, VIGILÂNCIA, VÍRUS

Autores(as):

PEDRO HENRIQUE TALASSI, IB - UNICAMP

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. CLARICE WEIS ARNS (orientadora), IB - UNICAMP

## INTRODUÇÃO:

As aves silvestres são importantes reservatórios de diversos vírus de importância econômica na avicultura e que apresentam potencial zoonótico, aumentando a disseminação de patógenos pelo comportamento migratório de algumas espécies de aves. Entre os vírus respiratórios mais comuns de serem encontrados em tais animais, podem ser citados os da família *Coronaviridae* (RNA fita simples, sentido positivo, envelopados), família *Paramyxoviridae* (RNA fita simples, sentido negativo, envelopados) e o vírus da Influenza A (família *Orthomyxoviridae* - RNA segmentado, envelopados), esquematizados na figura 1. De acordo com Wille *et al.* (2015), um estudo em patos selvagens demonstrou que pode ocorrer infecção mista (simultânea) de dois ou três vírus das famílias citadas. Os casos de infecções mistas são comuns em aves silvestres, principalmente se tratando de doenças virais respiratórias - como influenza aviária (IA), o vírus da doença de Newcastle (VDN) e o coronavírus aviário (ACoV).

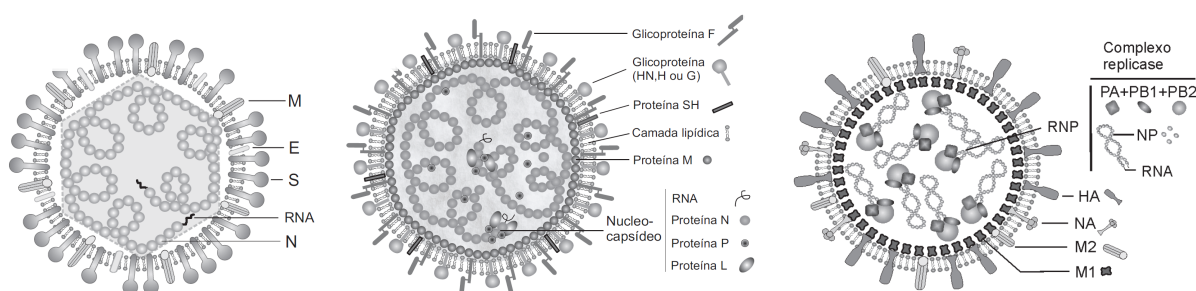


Figura 1 – Esquema geral dos vírus da família *Coronaviridae* (à esquerda), *Paramyxoviridae* (centro) e Influenza A (à direita). Fonte: Flores (2007).

A transmissão de patógenos entre as aves se dá principalmente pelo contato entre diferentes populações de aves migratórias, causando eventos de *spillover*, ou seja, uma mudança na dinâmica de uma doença, causada pelo contato de uma população de hospedeiros em potencial (não infectada previamente) com outra população reservatória, a qual possui uma alta abundância do patógeno.

Nesse contexto, a ausência de biossegurança em granjas permite o contato próximo de aves silvestres, sobretudo as migratórias, com aves comerciais e tem contribuído para o *spillover* e o aumento da virulência de alguns patógenos (Rohaim *et al.*, 2017), além da disseminação desses vírus por longas distâncias. A maioria das doenças infecciosas humanas tem como origem patógenos que anteriormente circulavam em animais silvestres - estima-se que 60 a 75% das doenças que infectam humanos apresentam origem zoonótica. Isso demonstra que o *spillover* tem papel fundamental no surgimento de novas enfermidades. Um exemplo é o vírus da gripe aviária, que passou a ser transmitida para humanos: de janeiro de 2003 a maio de 2023, foram registrados no mundo 874 casos de infecção humana pelo vírus influenza A (H5N1) sendo estes casos notificados em 18 países. Destes 874 casos, 458 foram fatais, representando 52% de mortalidade (WHO, 2023).

A compreensão dos fatores que facilitam a transmissão de patógenos de animais silvestres para humanos e a vigilância destes é fundamental para a identificação de agentes patogênicos circulantes e rápida intervenção, além de estabelecer estratégias visando à redução da frequência de eventos de *spillover*, além da identificação de possíveis mudanças nas características das doenças (Ellwanger & Chies, 2021). Assim, a investigação destes agentes em aves silvestres é crucial para o monitoramento epidemiológico e prevenção de que novas epidemias e pandemias possam surgir. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a presença de vírus da família Coronaviridae, Paramyxoviridae e Influenza A em amostras de suabes orofaríngeas e cloacais em aves silvestres capturadas no estado de São Paulo, no Bosque dos Jequitibás, localizado no município de Campinas.

## **METODOLOGIA:**

As amostras de suabes orofaríngeas e cloacais foram coletadas de aves do Bosque dos Jequitibás (Campinas/SP), conforme descritas na Tabela 1. Em seguida, colocadas em microtubos individuais, cortadas e identificadas, sendo encaminhadas para o Laboratório de Virologia e Biotecnologia Aplicada (VirBIO) em condições adequadas de armazenamento (caixas térmicas contendo gelo, mantidas a temperatura de 4 °C). No laboratório, as amostras foram acondicionadas em ultrafreezer a - 80 °C até o seu processamento. O processamento das amostras seguiu as seguintes etapas: preparação, extração, transcrição reversa e realização das PCRs gene-específicas. Todo o processo de coleta até a obtenção dos resultados por PCR se encontra esquematizado em ordem na figura 2. Em cada microtubo contendo um suabe foi adicionado 500 µL de Meio Essencial Mínimo (MEM), sendo homogeneizado em vórtex por 15 segundos. Em seguida, cada microtubo foi centrifugado por 2 minutos a 8.000 rpm em 4°C para coleta do sobrenadante.

O líquido coletado (140 µL) foi submetido à extração de RNA viral, utilizando o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen®). Para a síntese do cDNA por transcrição reversa, foi utilizado o kit High Capacity cDNA (Applied Biosystems®). As reações seguiram de acordo com os protocolos

disponibilizados pelos fabricantes. As PCRs gene-específicas foram realizadas de acordo com protocolos específicos publicados e bem consolidados para detecção de cada família viral.

Nº LVA	Identificação do Chip	Data Coleta	Local de Coleta	Espécie	Material
A001O	963003100028592	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A001C	963003100028592	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A002O	963003100028449	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A002C	963003100028449	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A003O	934000011663788	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A003C	934000011663788	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A004O	9630000000276623	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A004C	9630000000276623	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A005O	963000000003780	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A005C	963000000003780	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A006O	900108000766111	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A006C	900108000766111	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A007O	934000011663787	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A007C	934000011663787	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A008O	93400001166069	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A008C	93400001166069	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A009O	934000011766122	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A009C	934000011766122	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A010O	934000011663782	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A010C	934000011663782	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A011O	934000011663776	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A011C	934000011663776	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A012O	900108000766100	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Orofaringeo
A012C	900108000766100	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Caracara plancus</i> (carcará)	Swab Cloacal
A013O	963003100028556	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Tyto furcata</i> (coruja-das-torres)	Swab Orofaringeo
A013C	963003100028556	19/09/2022	Bosque dos Jequitibás	<i>Tyto furcata</i> (coruja-das-torres)	Swab Cloacal

Tabela 1 – Descrição das amostras coletadas no Bosque dos Jequitibás (Campinas/SP).

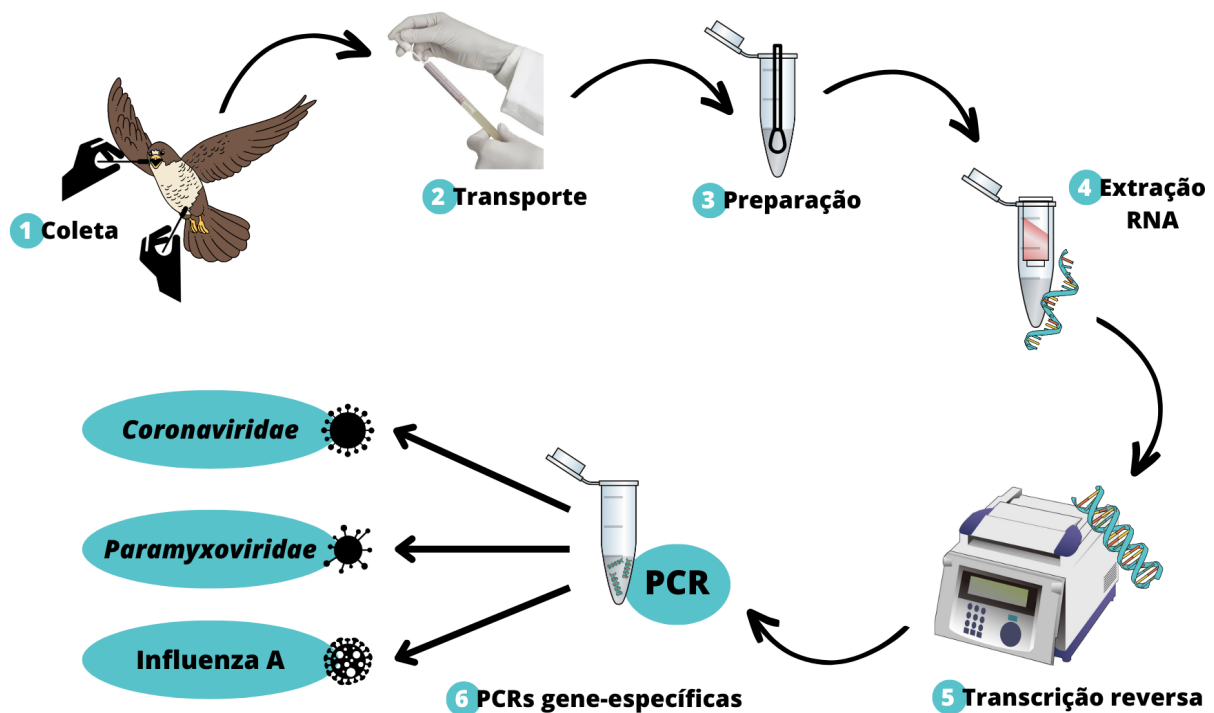


Figura 2 – Esquema da sequência metodológica dos experimentos realizados para detecção das famílias virais.

Para detecção da família *Coronaviridae*, foram utilizados os primers e temperaturas de termociclagem descritos por CHU et al. (2011). Foi realizada uma reação de Nested-PCR para amplificação de gene RdRp, gerando fragmentos de 440 pb. Amostras testadas para a família *Paramyxoviridae* foram submetidas às reações descritas por VANMECHELEN et al. (2022), com primers específicos para uma Nested-PCR. Os fragmentos amplificados a partir do gene conservado da proteína L possuíam 235 pb. A visualização dos fragmentos para essas duas famílias virais foi feita em Transiluminador após eletroforese em gel de agarose (1,5% para Pan-Coronaviridae e Pan-Paramyxoviridae), com brometo de etídio como intercalante de DNA. Por fim, a detecção de Influenza A (para qualquer subtipo) se deu através de PCR em Tempo Real, utilizando primers e sondas descritos por NAGY et al. (2021) que amplificam um segmento de 182 pb correspondente ao gene conservado da proteína de matriz (MP).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram coletadas 26 amostras (13 aves, cada uma com um suabe orofaríngeo e cloacal), conforme mostrado na tabela da Tabela 1, de aves do Bosque dos Jequitibás, em Campinas, proveniente de aves silvestres capturadas e em processo de tratamento para posterior soltura. A análise do gel de agarose 1,5% para a PCR e Pan-Coronaviridae mostrou a maioria das amostras como sendo negativas (Figura 3). Observa-se que houve formação de bandas fracas para a amostra A011 (identificadas em destaque com um quadro verde), o que dificulta a possibilidade de purificação e sequenciamento - por conta da baixa carga viral. Sendo assim, das 26 amostras 2 delas foram positivas (7,69% em relação ao total). Todas as amostras foram negativas para as reações de PCR Pan-Paramyxoviridae e Influenza A. Para fins de comparação, CHU et al. (2011) descreve uma alta porcentagem (12,5%) de amostras positivas para coronavírus em aves aquáticas e selvagens.

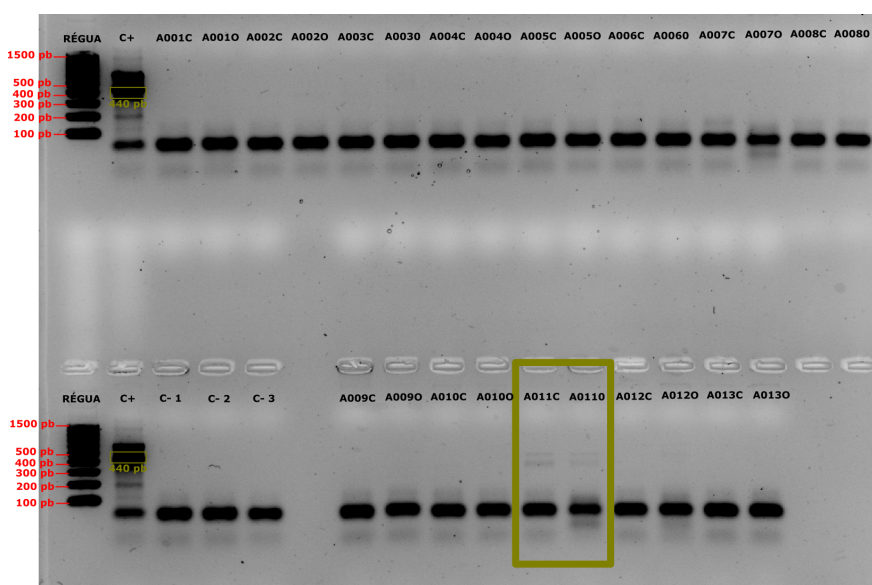


Figura 3 – Gel de agarose 1,5% lido em transiluminador com os resultados da PCR para Pan-Coronaviridae. O VBI (vírus da bronquite infecciosa) foi utilizado como controle positivo.

## CONCLUSÕES:

A vigilância epidemiológica é um fator importante para identificar famílias virais e possivelmente e prevenir novas epidemias, tanto entre os animais quanto de doenças com potencial zoonótico, sendo a detecção de patógenos uma das ações realizadas nesse contexto. Este trabalho identificou duas aves positivas para a família viral Coronaviridae, demonstrando a necessidade de constante monitoramento para identificar de forma mais rápida novos patógenos circulantes em animais, que podem impactar a saúde humana.

---

## BIBLIOGRAFIA

- 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.
- ELLWANGER, J. H.; CHIES, J. A. B. Zoonotic spillover: **Understanding basic aspects for better prevention**. *Genetics and Molecular Biology*, v. 44, n. 1, p. 1-18, 2021.
- FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**. 2007 Editora da UFSM, Santa Maria, RS. 888p.
- NAGY, A.; ČERNÍKOVÁ, L; KUNTEOVÁ, K; DIRBÁKOVÁ, Z.; THOMAS, S. S.; SLOMKA, M.J.; DÁN, Á.; VARGA, T.; MÁTÉ, M.; JIŘINCOVÁ, H.; BROWN, I. H. **A universal RT-qPCR assay for "One Health" detection of influenza A viruses**. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0244669.
- ROHAIM, M. A.; EL NAGGAR, R. F.; HELAL, A. M.; HUSSEIN, H. A.; MUNIR, M. **Reverse spillover of avian viral vaccine strains from domesticated poultry to wild birds**. *Vaccine*, v. 35, p. 3523-3527, 2017.
- VANMECHELEN, B., MEURS, S., HOREMANS, M., LOOSEN, A., JOLY MAES, T., LAENEN, L., VERGOTE, V., KOUNDOUNO, F. R., MAGASSOUBA, N., KONDE, M. K., CONDÉ, I. S., CARROLL, M. W., & MAES, P. (2022). **The characterization of multiple novel paramyxoviruses highlights the diverse nature of the subfamily *Orthoparamyxovirinae***. *Virus evolution*. <https://doi.org/10.1093/ve/veac061>
- WILLE, M.; AVRIL, A.; TOLF, C.; SCHAGER, A.; LARSSON, S.; BORG, O.; OLSEN, B.; WALDENSTRÖM, J. **Temporal dynamics, diversity, and interplay in three components of the virodiversity of a Mallard population: Influenza A virus, avian paramyxovirus and avian coronavirus**. *Infection, Genetics and Evolution*, v. 29, p. 129-137, 2015.
- World Health Organization (WHO). **Human infection with avian influenza A(H5) viruses**. Disponível em: [https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai\\_2023\\_0714.pdf?sfvrsn=5f006f99\\_117](https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_2023_0714.pdf?sfvrsn=5f006f99_117). Acesso em: 26 de julho de 2023.
-