

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Detecção e Caracterização Molecular de Poxvírus
Aviário em *Culex* sp. coletados no Peridomicílio de
Áreas Rurais e Periurbanas no Município de
Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.**

Carolina Soares van der Meer

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO
POXVÍRUS AVIÁRIO EM *Culex* sp. COLETADOS NO
PERIDOMICÍLIO DE ÁREAS RURAIS E PERIURBANAS NO
MUNICÍPIO DE SEROPÉDICA, ESTADO DO RIO DE JANEIRO.**

CAROLINA SOARES VAN DER MEER

Sob a Orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos

Co-orientação
Carlos Luiz Massard

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Julho de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M495d Meer, Carolina Soares van der , 1995-
Detecção e Caracterização Molecular de Poxvírus
Aviário em Culex sp. coletados no Peridomicílio de
Áreas Rurais e Periurbanas no Município de Seropédica,
Estado do Rio de Janeiro / Carolina Soares van der
Meer. - Rio de Janeiro, 2021.
74 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Coorientador: Carlos Luiz Massard.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias, 2021.

1. Boubá Aviária. 2. Culex. 3. Filogenia. 4.
Detecção Molecular. 5. Poxvírus Aviário. I. Azevedo
Santos, Huarrisson, 1980-, orient. II. Luiz Massard,
Carlos, 1947-, coorient. III Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias. IV. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3182 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.055096/2021-17

Seropédica-RJ, 03 de agosto de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CAROLINA SOARES VAN DER MEER

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 08/07/2021

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da dissertação.

(Assinado digitalmente em 03/08/2021 16:56)

HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: 3701492

(Assinado digitalmente em 03/08/2021 16:30)

PAULO CESAR AUGUSTO DE SOUZA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matricula: 386067

(Assinado digitalmente em 26/08/2021 10:40)

DANIEL DA SILVA GUEDES JUNIOR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 072.876.757-06

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3182**, ano:
2021, tipo: **ATA**, data de emissão: **03/08/2021** e o código de verificação: **08d31d2575**

Esse trabalho é dedicado aos que não puderam estar aqui hoje.

Zilda Soares da Silva (★1935 † 2020)

Cody (★2006 † 2019)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento dessa pesquisa. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos projetos de pesquisa do Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE).

Aos meus pais Carla Soares van der Meer e Pieter van der Meer pelo apoio e incentivo durante as minhas escolhas profissionais e pessoais desde meus primeiros passos. Desejo poder ter sido merecedora de todo esforço de vocês.

Ao meu irmão Willen Pieter van der Meer Neto por sempre me cativar, me apoiar e me presentear com uma das maiores surpresas da minha vida: minha querida sobrinha Luna de Almeida van der Meer.

Aos meus avós Lêda van der Meer (*in memoriam*) e Willem Pieter van der Meer (*in memoriam*), especialmente minha vó Zilda Soares da Silva (*in memoriam*) por fazer parte ativa da minha criação e contribuir para ser quem eu sou hoje. Vocês deixaram muitas saudades.

Meus sinceros agradecimentos ao meu orientador Huarrisson Azevedo Santos por toda paciência, conversas sinceras, oportunidades, conhecimentos concedidos e compreensão, todos fundamentais para minha formação profissional e pessoal.

A Debora Regina Lopes dos Santos, por me inserir com tanto carinho e dedicação no meio acadêmico, enfatizando sempre o espaço do Médico Veterinário na Virologia e me incentivando a crescer profissionalmente.

A Rômulo Lucas da Costa Júnior pela companhia nos momentos de alegria e de tristeza que circundaram essa etapa da minha vida. Sem você isso não teria sido possível.

Um agradecimento especial a Nathalia Alves de Senne e Thamires Rezende Araújo pela ajuda técnica científica indispensável para a conclusão deste trabalho.

A colega de trabalho Thamyris Sampaio Vilela pela disponibilização do material e técnicas utilizadas na confecção desse trabalho.

A Josemar César Gonçalves por todas as ideias mirabolantes, ensinamentos, ajuda técnica e apoio psicológico durante o mestrado.

A todos os companheiros discentes do Laboratório de Sanidade Avícola Nathalia Senne, Thamires Rezende, Miguel Mota, Patrícia Paulino, Lucia Herrán e Tays Camilo por todos os momentos de descontração, colaborações e ajuda no desenvolvimento e execução das técnicas utilizadas na confecção desse trabalho. “Vai tudo dar certo!!!”.

As minhas melhores amigas Erica Rodrigues de Matos Silva e Amanda Couto Silva por servirem de apoio, oferecendo companhia e bons momentos desde o início da minha jornada na graduação até os dias atuais.

Por fim, agradeço aos amigos de quatro patas que são motivo de muita alegria, em especial ao Bartozinho, meu cachorro “seropedicano” e ao meu “cachorros” Cody (*in memoriam*) por fazer parte da minha vida durante seus 13 anos.

Muito obrigada!

RESUMO

VAN DER MEER, Carolina Soares. **Detecção e caracterização molecular do Poxvírus Aviário em *Culex* sp. coletados no peridomicílio de áreas rurais e periurbanas no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.** 2021. 75p. Dissertação (Mestrado, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A Boubá Aviária é uma enfermidade viral altamente contagiosa cuja maior abrangência geográfica de casos contempla regiões tropicais e subtropicais, afetando aves domésticas e selvagens. Estudos experimentais apontam que a principal forma de transmissão se dá através do repasto sanguíneo com dispersão viral realizada por mosquitos vetores do gênero *Culex*, alimentados com sangue de aves infectadas. Desta forma, o objetivo desse estudo foi estabelecer a frequência de *Culex* sp. com material genético de *Avipoxvírus* através da técnica de PCR no peridomicílio de áreas rurais e periurbanas do município de Seropédica, no Rio de Janeiro e realizar análise filogenética com base no gene *p4b* a partir de amostras positivas. Foram coletados 2839 mosquitos dos gêneros *Anopheles*, *Aedes* e *Culex*, sendo o gênero *Culex* o mais abundante, compreendendo 96,23% (2732/2839) do montante total, onde a pesquisa de *Avipoxvírus* foi realizada em 300 fêmeas alimentadas oriundas dos bairros de São Miguel, Valão das Louças e Campo Lindo. Dos espécimes coletados, um total de 13,66% (41/300) das amostras de fêmeas testadas apresentaram-se positivas na reação de detecção, onde 13,63% das positivas (21/154) foram coletadas no bairro de Campo Lindo, 16,67% (16/96) em São Miguel e 12% (6/50) em Valão das Louças. Não houve diferença significativa na frequência de *Avipoxvírus* em *Culex* sp. entre os bairros analisados ($p > 0,05$). A análise filogenética foi realizada comparando 347 sequências disponíveis no GenBank, de forma a agrupar os subclados A1 a A7, B1 a B3 e C. Pela primeira vez no Brasil, foi possível reportar a presença do subclado A1 em amostras oriundas de *Culex* sp. contendo DNA de *Avipoxvírus*. A distância evolutiva do gene *p4b* das amostras sequenciadas, comparada entre as áreas avaliadas, foi capaz de demonstrar maior divergência genética em áreas rurais ($0,0061 \pm 0,0021$) quando comparada a áreas periurbanas ($0,0038 \pm 0,0016$) nesse estudo. Esse trabalho possibilitou a otimização de uma técnica de PCR eficaz para detecção de *Avipoxvírus* diretamente do DNA extraído de *Culex* sp., além da complementação de dados referentes à biologia do vetor e melhoria das técnicas de monitoramento e de controle da Boubá Aviária no Estado do Rio de Janeiro.

Palavras chave: Boubá Aviária; *Culex*; Filogenia; Detecção Molecular; Poxvírus Aviário.

ABSTRACT

VAN DER MEER, Carolina Soares. **Detection and molecular characterization of *Avipoxvirus* in *Culex* sp. collected in the peridomicile of rural and periurban areas in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro. 2021.** 75p. Dissertação (Mestrado, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

Avian Pox is a highly contagious viral disease whose largest geographical range of cases covers tropical and subtropical regions, affecting both domestic and wild birds. Experimental studies show that the main form of transmission occurs during blood feeding by vectors of the genus *Culex*, previously fed with the blood of infected birds. Therefore, the aim of this study was to establish the frequency of *Culex* sp. with *Avipoxvirus* DNA through PCR assay, in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro and then perform a phylogenetic analysis based on the *p4b* gene from positive samples. In this study, 2839 mosquitoes belonging to *Anopheles*, *Aedes* and *Culex* genera were collected, with the *Culex* sp. genus being the most abundant, comprising 96.23% (2732/2839) of the total amount, where the *Avipoxvirus* detection was conducted on 300 fed females from the neighborhoods: São Miguel, Valão das Louças and Campo Lindo. Of the collected specimens, a total of 13.66% (41/300) of the samples of females tested were positive in the detection reaction, where 13.63% of the positives (21/154) were collected at Campo Lindo neighborhood, 16.67% (16/96) at São Miguel and 12% (6/50) at Valão das Louças. There was no significant difference in the frequency of *Avipoxvirus* in *Culex* sp. among the neighborhoods analyzed ($p>0.05$). The phylogenetic analysis was performed comparing 347 sequences available in GenBank, in order to group the subclades A1 to A7, B1 to B3 and C, and, for the first time in Brazil, it was possible to report the presence of subclade A1 in samples of *Culex* sp. with *Avipoxvirus* DNA. The evolutionary distance of the *p4b* gene of the sequenced samples, compared between the evaluated areas, was able to demonstrate larger genetic divergence in rural areas (0.0061 ± 0.0021) when compared to periurban areas (0.0038 ± 0.0016) in this study. This work enabled the improvement of an effective PCR technique for the detection of *Avipoxvirus* directly in *Culex* sp. DNA, in addition to complementing data on vector biology and improving the monitoring and control techniques of Avian Pox in the State of Rio de Janeiro.

Keywords: Avian Pox; *Culex*; Phylogeny; Molecular Detection; *Avipoxvirus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Locais de coleta identificados pelo bairro, concentração populacional e zona em rural ou periurbana	10
Tabela 2 - Coordenadas geográficas de latitude e longitude utilizadas para o georreferenciamento e confecção do mapa de Kernel dos pontos de captura de mosquitos realizada no período de Junho de 2016 a Julho de 2017 no município de Seropédica, Rio de Janeiro	11
Tabela 3 - Oligoiniciadores das espécies contidas no tríplex utilizado para distinção das fontes alimentares das fêmeas do gênero <i>Culex</i> utilizadas no estudo.....	13
Tabela 4 - Oligoiniciadores selecionados para serem utilizados na PCR convencional para detecção de <i>Avipoxvírus</i> em fêmeas ingurgitadas do gênero <i>Culex</i>	14
Tabela 5 - Relação das amostras positivas para <i>Avipoxvírus</i> em PCR convencional em relação ao bairro de coleta, tipo de zona e fonte alimentar	25
Tabela 6 - Distância evolutiva entre sequências do gene <i>p4b</i> que codifica para proteína do nucleocapsídeo de <i>Avipoxvírus</i> obtidos de <i>Culex</i> sp. no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Coloração negativa de partículas típicas de poxvírus semelhantes a tijolos, obtidas de lesões cutâneas de <i>Falco peregrinus</i>	04
Figura 2 - Distribuição dos países nos quais a Boubá Aviária foi relatada	06
Figura 3 - Representação das formas clínicas mais frequentes da Boubá Aviária em aves domésticas	07
Figura 4 - Fêmea não alimentada de <i>Culex quinquefasciatus</i>	09
Figura 5 - Localização geográfica do município de Seropédica, RJ e dos bairros onde foram realizadas as coletas: Fazenda São Miguel, Valão das Louças e Campo Lindo	10
Figura 6 - Total de mosquitos dos gêneros <i>Culex</i> , <i>Aedes</i> e <i>Anopheles</i> coletados em áreas rurais e periurbanas no município de Seropédica, Rio de Janeiro	17
Figura 7 - Espécime macho de <i>Culex</i> sp. clarificado com solução de Hidróxido de Potássio 10% observado através de lupa	18
Figura 8 - Aparelho genital externo de espécimes fêmea (acima) e macho (abaixo) de <i>Culex</i> sp. clarificados com solução de Hidróxido de Potássio 10% observados através de lupa	18
Figura 9 - Aparelho genital externo de macho identificado como pertencente à espécie <i>Culex quinquefasciatus</i> processado e montado em lamínula sobre lâmina visto através de microscopia óptica com aumento de 100x	19
Figura 10 - Gel de agarose 1,5% corado em brometo de etídio mostrando produtos de 678pb amplificados em PCR convencional com alvo no gene constitutivo COI das amostras de DNA extraídas das fêmeas ingurgitadas de <i>Culex</i> sp.	20
Figura 11 - Relação da quantidade de fêmeas ingurgitadas alimentadas com sangue das espécies <i>Canis familiaris</i> , <i>Homo sapiens sapiens</i> e <i>Gallus gallus</i>	21
Figura 12 - Taxas de coalimentação de fêmeas ingurgitadas de <i>Culex</i> sp. alimentadas com sangue das espécies <i>Canis familiaris</i> , <i>Homo sapiens sapiens</i> e <i>Gallus gallus</i>	21
Figura 13 - Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação do primeiro ensaio de limite de detecção	22
Figura 14 - Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação do ensaio de limite de detecção juntamente com ensaio de concentração de oligonucleotídeos	22
Figura 15 - Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação da reação do dia 20/10/2020	23
Figura 16 - Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação da reação 1 do dia 28/10/2020	24

Figura 17 - Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação da reação 2 do dia 28/10/2020	24
Figura 18 - Mapa de Kernel demonstrando áreas de maior taxa de DNA por <i>Avipoxvírus</i> em <i>Culex</i> sp. avaliados no estudo. Áreas mais alaranjadas revelam locais de maior risco de ocorrência da Boubá Aviária	25
Figura 19 - Árvore filogenética derivada das sequências do gene <i>p4b</i> isolados nesse estudo. Os grupos externos compreenderam sequências de <i>Squirrelpoxvírus</i> , <i>Cowpoxvírus</i> , <i>Sheeppoxvírus</i> e <i>Goatpoxvírus</i> . Escala indica número de substituições de nucleotídeos <i>per site</i>	29

LISTA DE ABREVIACOES

μL	Microlitros
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Celsius
mg	Miligramas
min	Minutos
ml	Militros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramas
APV	<i>Avipoxvírus</i>
ChPVs	<i>Chordopoxvírus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
ORF	<i>Open Reading Frames</i>
kb	Quilobase
pb	Pares de bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
pH	Potencial hidrogeniônico
TAE	Tris Ácido Acético
Cx	<i>Culex</i>
HRM	<i>High Resolution Melting</i>
COI	Citocromo Oxidase subunidade I
NaCl	Cloreto de sódio
Tris-HCl	Ácido Tricloro Acético
CL	Campo Lindo
VL	Valão das Louças
SM	São Miguel

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	01
2 REVISÃO DE LITERATURA	03
2.1 A Boubá Aviária	03
2.2 Histórico da Doença	03
2.3 Etiologia da Boubá Aviária	04
2.4 Epidemiologia	05
2.5 Patogenia do <i>Avipoxvírus</i>	06
2.6 Sinais Clínicos da Boubá Aviária	07
2.7 Papel de Culicídeos como vetores da Boubá Aviária	08
2.8 Distinção entre mosquitos da subfamília Culicinae	08
2.9 Diagnóstico e monitoramento da Boubá Aviária	09
3 MATERIAIS E MÉTODOS	10
3.1 Local de estudo	10
3.2 Coleta de mosquitos e identificação morfológica	11
3.3 Extração de material genético	12
3.3.1 Salting Out	12
3.4 Verificação da qualidade do DNA genômico através do gene constitutivo citocromo oxidase subunidade I (COI)	13
3.5 Ensaio de <i>Triplex</i> qPCR para detecção de fonte alimentar de <i>Culex</i> sp	13
3.6 Padronização de ensaio de PCR convencional para detecção de <i>Avipoxvírus</i> em <i>Culex</i> sp.	14
3.6.1 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores	14
3.6.2 Obtenção dos controles positivos de <i>Avipoxvírus</i>	14
3.6.3 Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores	14
3.6.4 Limite de detecção do Ensaio de PCR convencional	14
3.6.5 Amplificação de <i>Avipoxvírus</i> pela PCR convencional	15
3.6.6 Purificação dos produtos de PCR convencional com alvo no gene <i>p4b</i>	15
3.6.7 Sequenciamento e alinhamento das sequências	15
3.6.8 Análise Filogenética	15
3.7 Construção do mapa de calor (Mapa de Kernel)	15
3.8 Análise Estatística	16
4 RESULTADOS	17
4.1 Mosquitos coletados e identificação morfológica	17
4.2 Verificação da qualidade do DNA genômico através do gene constitutivo citocromo oxidase subunidade I (COI)	19
4.3 Ensaio de <i>Triplex</i> qPCR para detecção de fonte alimentar de <i>Culex</i> sp	20
4.4 Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores e ensaio de limite de detecção da PCR convencional com alvo no gene <i>p4b</i> de <i>Avipoxvírus</i>	21
4.5 Amplificação do gene <i>p4b</i> <i>Avipoxvírus</i> pela PCR convencional	23
4.6 Análise do sequenciamento das amostras positivas para <i>Avipoxvírus</i>	27
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	35
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
9 ANEXOS	43
ANEXO I – Relação de amostras positivas para sangue de galináceos no <i>Triplex</i> qPCR e	

correlação com positivas para <i>Avipoxvirus</i>	43
ANEXO II – Lista de informações das amostras e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para comparação nesse estudo	51

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira é um dos setores que mais se desenvolveu na economia nos últimos anos. Em 2019, o Brasil liderou mais uma vez o ranking mundial no setor avícola, sendo reconhecido como maior exportador mundial de carne de frango, tendo registro de 4,21 milhões de toneladas exportadas, com um aumento na produção de 3,3% em relação a 2018. Também é reconhecido como o segundo maior produtor de frangos de corte com 13,2 milhões de toneladas geradas por ano (ABPA, 2020).

A cadeia produtiva de frangos no Brasil é definida pela sua expansão voraz com seus pilares de aperfeiçoamento relacionados às áreas da genética animal, nutrição, tecnologia de equipamentos utilizados e no âmbito sanitário (ESPINDOLA, 2012).

Apesar do constante progresso obtido pelas inovações tecnológicas implementadas nas indústrias de alto desempenho, alguns núcleos familiares e grupos sociais optam pelo consumo de carne e ovos da própria produção de aves. Essas atividades também são associadas à geração de renda familiar, geralmente integrada a outros tipos de produção agrícola com mesma finalidade. Prática esta, portanto, conhecida como criação do tipo subsistência (COELHO & FABRINI, 2014).

A criação do tipo subsistência é considerada uma importante atividade de movimentação econômica no campo que, além de suprir necessidades alimentares básicas de um grupo familiar, também é responsável pelo processo de circulação de capital através da produção e elaboração em pequena escala de produtos agrícolas, a fim de satisfazer as necessidades de consumo locais (GARCIA Jr., 1983). Entretanto, esse tipo de criação doméstica está sujeita a dificuldades de manejo sanitário, devido à relação dos métodos de biossegurança adotados, que contemplam fatores ambientais e culminam no bem estar do plantel, como qualidade das instalações, planejamento vacinal e de higiene e manipulação dos insumos utilizados. Casos esses métodos não sejam adotados de forma assertiva, pode ocorrer a entrada e disseminação de doenças de interesse para a avicultura.

Os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apresentam o município de Seropédica como possuidor de pequenas propriedades rurais cuja ocupação é de uma área de 9.302 hectares de estabelecimentos agropecuários, majoritariamente de agricultura familiar diversificada. Sendo 133 o número registrado de estabelecimentos que criam aves, do total de 444 estabelecimentos (IBGE, 2017).

A detecção da circulação de doenças que podem causar prejuízos econômicos à criação do tipo subsistência é de extrema importância para garantir a segurança alimentar e estabelecer melhores práticas de manejo, prevenção e controle nesses locais, a fim de evitar disseminação e agravo nos estabelecimentos industriais de grande porte, levando a potenciais perdas econômicas no setor avícola a nível nacional e internacional. (MARTINS, 2005) Dentre estas enfermidades, destaca-se a Boubá Aviária, umas das mais frequentes doenças virais observadas em aves criadas nesse modelo de produção.

A Boubá Aviária também é chamada de varíola, epiteloma contagioso ou pipoca, e afeta aves domésticas e selvagens em todo o Brasil. Os *Avipoxvírus* podem ser transmitidos por contato direto com partículas virais infecciosas ou indiretamente através de vetores artrópodes mecânicos (TRIPATHY & REED, 2008).

Estudos anteriores relataram o papel das espécies *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* como importantes vetores mecânicos na transmissão do vírus da Boubá Aviária (ALEY et al., 2010 & YEO et al., 2019), que ocorre devido à permanência de partículas virais viáveis na probóscide dos insetos, perdurando por até 14 dias, sem evidência de replicação nos tecidos desses insetos segundo estudo experimental (DAMASSA, 1966). Entretanto,

nenhuma investigação do agente viral em mosquitos vetores foi publicada no Brasil, e poucas abordagens técnicas sensíveis para detecção molecular foram desenvolvidas, dificultando o estudo da circulação do vírus e sua identificação em espécies isoladas de mosquitos com capacidade de vetoração, como as do gênero *Culex* (VILELA, 2019).

Neste contexto, este trabalho teve como principais objetivos a detecção molecular e a análise da variabilidade genética do *Avipoxvírus* em mosquitos do gênero *Culex* coletados em áreas peridomiciliares de zonas rurais e periurbanas relacionadas à criação de aves do tipo subsistência no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Bouba Aviária

A bouba aviária é reconhecida por ser uma enfermidade viral de propagação lenta, com alta incidência em países tropicais e subtropicais. (LEBDAH et al., 2019). A doença possui distribuição cosmopolita, e afeta aves domésticas e silvestres, sem manifestação de predileção por sexo ou idade, apesar de ser mais comum e desencadear quadros graves em aves jovens (EO et al., 2011; ALEHEGN et al., 2014; MOÇO et al., 2008).

Também conhecida como varíola aviária, a bouba está na lista das doenças de notificação obrigatória mensal de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) devido ao seu caráter altamente contagioso e dispersivo.

A doença é observada apresentando dois principais tipos de evolução clínica que podem ocorrer separadamente ou em conjunto: a forma cutânea, que é caracterizada pela formação de nódulos proliferativos exofíticos e autolimitantes comumente vistos em áreas desprovidas de penas, como pálpebras, narinas, face, cloaca e membros pélvicos; e a forma diftérica, onde as lesões são majoritariamente fribrinonecróticas proliferativas que se localizam na membrana mucosa da boca, esôfago e trato respiratório superior (TRIPATHY & REED, 2008; FERREIRA et al., 2018). A forma sistêmica da doença, considerada uma rara e aguda apresentação da enfermidade, foi relatada apenas em algumas espécies de canários e está associada à alta mortalidade (VAN RIPER & FORRESTER, 2007; STROUD, 1933).

As lesões características da forma cutânea da doença, que se apresentam em regiões sem penas, são comumente associadas à facilidade de acesso de picadas de artrópodes transmissores do vírus, como mosquitos e ácaros (HESS et al., 2011; VARGAS et al., 2011; PROCTOR & OWENS, 2000).

A mortalidade ligada à bouba aviária é baixa na forma cutânea. No entanto, se eleva quando a apresentação clínica da doença é diftérica, conjunta, ou quando associada a outros patógenos de importância (TRIPATHY & REED, 2008).

Sua propagação se dá principalmente pelo papel de vetoração mecânica desses artrópodes. Entretanto, aerossóis gerados pelas aves infectadas, o contato direto com lesões ou a ingestão de alimentos ou água contaminados também são importantes formas de transmissão da enfermidade (VARGAS et al., 2011; BERCHIERI Jr. et al., 2009).

2.2 Histórico da Doença

A bouba aviária foi uma das primeiras doenças de interesse veterinário na área a serem descritas quanto aos seus aspectos macroscópicos, devido à facilidade de detecção das lesões e consequente associação à causa (HEUSINGER, 1844; VAN RIPER & FORRESTER, 2007).

Relatos não publicados de surtos onde lesões muito semelhantes descritivamente às apresentadas em casos de Bouba Aviária, sugerem que a enfermidade pode ter sido introduzida em aves domésticas em períodos anteriores ao século XX (WILKESKI, 2004).

Os diagnósticos presuntivos clínicos eram confirmados em virtude da associação das lesões encontradas nas aves afetadas com achados histopatológicos condignos. A primeira evidência foi descrita por Bollinger em 1873, que visualizou em seus achados microscópicos de células infectadas por um *Avipoxvirus* um tipo de inclusão citoplasmática eosinofílica característica em células epiteliais, e que é considerado hoje, sinal patognomônico da enfermidade. O achado foi considerado pioneiro por conseguir realizar a associação precoce das infecções antes mesmo da implementação de técnicas como isolamento viral (BOLLINGER, 1873; MOHAN & FERNANDEZ, 2008; BOLTE et al., 1999).

No início do período pós Segunda Guerra Mundial, a microbiologia e a patologia animal tiveram acesso a microscópios eletrônicos, intensificando os conhecimentos

relacionados à patogênese de diversas doenças infecciosas, incluindo aspectos relacionados à Boubá Aviária (BOLTE et al., 1999).

O primeiro relato relacionando a hematofagia de artrópodes à transmissão do vírus da Boubá Aviária foi descrito detalhadamente em 1936, em experimentos que demonstraram a capacidade de espécies não identificadas dos gêneros *Culex* e *Aedes* de carrear e transmitir o vírus para aves susceptíveis, reforçando estudo realizado por Kliger, em 1928, que apontou primeiramente a possibilidade de vetoração desses gêneros (BRODY, 1936; DAMASSA, 1966; KLIGER, 1928).

A influência de mosquitos do gênero *Culex* na participação e disseminação da doença em populações de aves pôde ser evidenciada nas Ilhas Santa Cruz, um grupo de ilhas isoladas no oceano pacífico, onde mosquitos da espécie *Cx. quinquefasciatus* foram coletados e correlacionados à casuística da Boubá Aviária em aves selvagens da região devido aos seus hábitos alimentares (WHITEMAN, 2005).

2.3 Etiologia da Boubá Aviária

O vírus da Boubá Aviária está classificado no gênero *Avipoxvirus*, pertencente à família Poxviridae e subfamília Chordopoxviridae (MURPHY, 1999; CANAL & DIEL, 2017). A partícula viral do agente é envelopada e consiste em um core central bicôncavo e eletrodense, apresentando dois corpos laterais em cada concavidade, revestida por um envelope viral. Todo revestimento externo consiste em arranjos de túbulos aleatórios. Em geral, a partícula viral é grande, sendo um dos maiores vírus já descritos na literatura, com formato semelhante a um tijolo arredondado (Figura 1). Com medidas que chegam a 330 x 280 x 200 nm, apresentam genoma composto de uma fita dupla linear de ácido desoxirribonucleico – DNA (do inglês “*deoxyribonucleic acid*”) – com cerca de 260-365 kpb, possuindo uma região central de codificação cercada de dois idênticos terminais invertidos de 9.5 kpb, contendo 260 fases de leitura aberta – ORFS (do inglês “*open reading frames*”) –, onde 101 delas demonstram similaridade com genes com funcionalidade conhecida (LEBDAH et al., 2019; SKINNER, 2008; CANAL & DIEL, 2017; TRIPATY & REED, 2013).

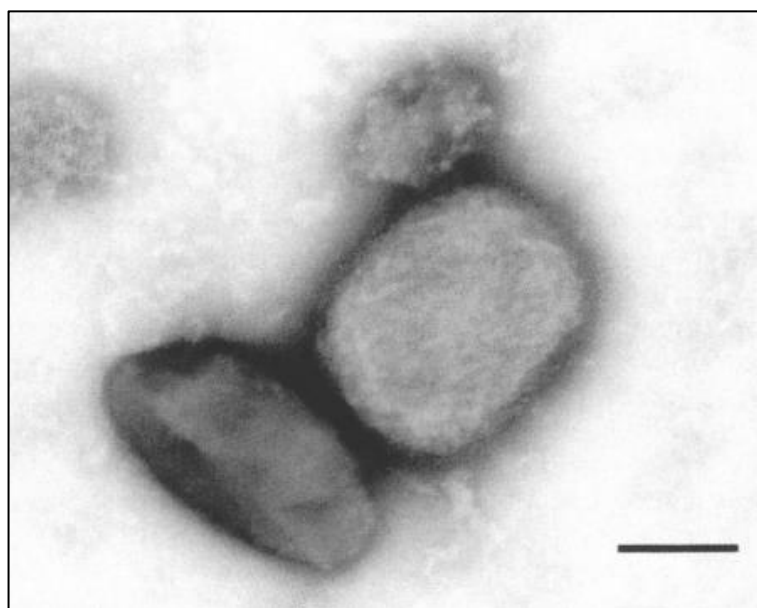


Figura 1: Coloração negativa de partículas típicas de Poxvírus semelhantes a tijolos, obtidas de lesões cutâneas de *Falco peregrinus*. Escala: 15nm. **Fonte:** Krone, 2016.

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses*, o gênero *Avipoxvirus* é exclusivo na subfamília Chordopoxviridae a ter a capacidade de infectar espécies de vertebrados que não estejam categorizadas na classe Mammalia, sendo o único capaz de infectar aves (ICTV, 2016; GUBSER et al., 2004).

A comparação do genoma dos *Avipoxvirus* (APV) com outros chordopoxvirus (ChPVs) expõe 65 genes homólogos conservados responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas na transcrição e biogênese de mRNA (do inglês “*messenger ribonucleic acid*”), replicação e reparo de DNA, metabolismo de nucleotídeos e processamento de proteínas vinculadas à estrutura viral (AFONSO et al., 2000; MOCKETT et al., 1992; MULLER et al., 1978).

O genoma do *Avipoxvirus* inclui seis genes putativos com funções de modificação de proteínas, envolvendo serina/treonina quinase (PK), uma metaloprotease, uma tirosina PK e uma tirosina/serina fosfatase, todas envolvidas no processo fundamental de fosforilação de proteínas virais durante a síntese e montagem de novas partículas virais viáveis (AFONSO et al., 2000; ZANTINGE et al., 1996; BETAKOVA et al., 1999).

A classificação padrão para diferenciação de cepas de *Avipoxvirus* se baseia na comparação de genes não essenciais constitutivos e em genes responsáveis pela imunomodulação. Tal classificação separa as cepas em três clados, com caráter espécie-específico, comumente isoladas ao redor do globo; são elas do grupo A, do grupo B e do grupo C, afetando respectivamente galinhas, canários e psitacídeos com maior frequência (JARMIN et al., 2006; MANAROLLA et al., 2010).

Mais recentemente, houve a descoberta de uma nova cepa isolada da espécie *Platycercus elegans* que não possuiu características para ser classificada em nenhuma das três cepas iniciais, sendo classificada, portanto, como pertencente a um novo grupo intitulado D, sugerindo que a classificação primária baseada nos genes padrão para a diferenciação de estirpes se mostra insuficiente (SLOCOMBE et al., 2013).

2.4 Epidemiologia

O gênero *Avipoxvirus* é conhecido por possuir vasta distribuição a nível mundial (Figura 2), com poucos relatos exceção de áreas no Ártico e em algumas regiões isoladas, podendo afetar uma diversidade considerável de espécies domésticas e silvestres. A doença já foi reportada em 278 espécies de aves pertencentes a 23 ordens distintas (BOLTE et al., 1999; VAN RIPER & FORRESTER, 2007).

A característica endêmica da enfermidade em diversos locais do globo pode ser explicada devido às baixas taxas de mortalidade apresentadas, favorecendo a permanência do vírus por maior tempo entre as populações. Embora atinja níveis globais, a maior ocorrência de casos ocorre em regiões tropicais e subtropicais (REED & SCHRADER, 1989; YOSHIKAWA & ALAM, 2002).

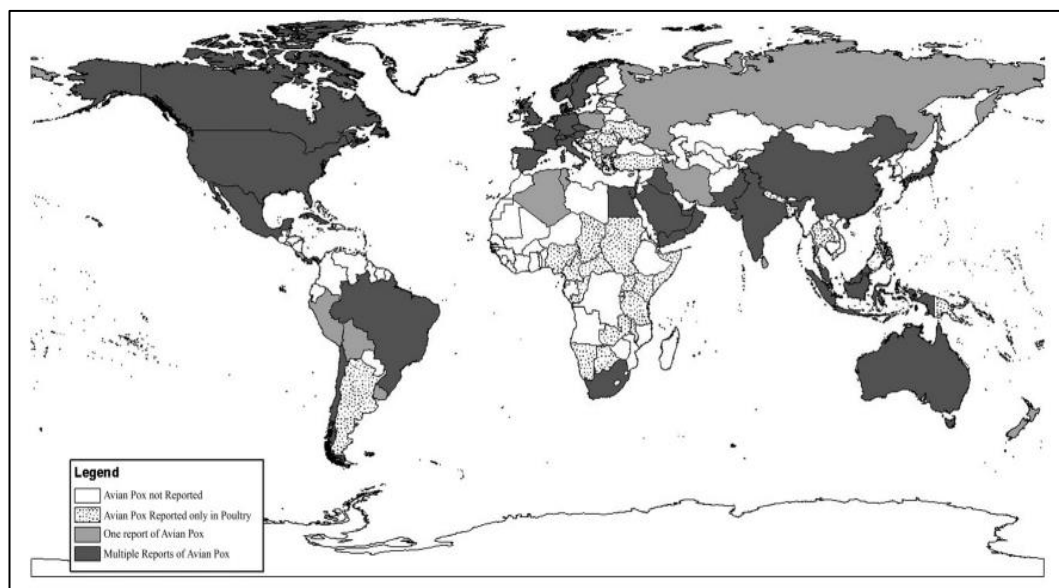


Figura 2: Distribuição dos países nos quais a Boubá Aviária foi relatada. Os países destacados em cinza escuro são aqueles onde enfermidade foi relatada a partir de múltiplas famílias de aves; em cinza claro indica relato de um único registro; áreas do globo pontilhadas indicam regiões onde foram realizados apenas estudos envolvendo aves comerciais como galinhas e perus; e em branco áreas onde a doença ainda não foi detectada. **Fonte:** van Riper & Forrester, 2007.

Os relatos de casos referentes à presença do agente etiológico e manifestações mais graves da doença em plantéis de frangos em regiões dos Estados Unidos da América afetam diretamente, em aspectos econômicos, uma região onde a enfermidade já se encontrava em situação de controle. (TRIPATHY & REED, 2013).

A distribuição da doença está diretamente associada a diversos fatores bióticos e abióticos, tais como a temperatura, umidade, densidade de vetores e densidade de hospedeiros susceptíveis, sendo um dos mais relevantes a quantidade de vetores capazes de carrear e transmitir o *Avipoxvírus* (FORRESTER, 1991; VAN RIPER et al., 2002). Desta forma, em épocas mais quentes e chuvosas do ano, onde o número de vetores tende a aumentar, a transmissão da enfermidade se intensifica, ocasionando muitas das vezes surtos nesses períodos (AKEY et al., 1981; FORRESTER, 1991).

Entretanto, nas regiões mais quentes do globo, a Boubá Aviária pode ser relatada durante todo o ano, mais frequentemente nos meses de outono e inverno, onde os índices de pluviosidade ascendem e permitem índices altos de reprodução por parte dos vetores (AKEY et al., 1981; LAPUENTE et al., 2009).

2.5 Patogenia do *Avipoxvírus*

O período de incubação dos *Avipoxvírus* varia em relação ao tipo de hospedeiro e da cepa. Foi relatado na literatura um intervalo de quatro a dez dias em galinhas e perus, tendo todo o curso da doença desde a infecção até a completa cicatrização das lesões uma duração de até quatro semanas (TRIPATHY & REED, 2013).

Logo após a invasão celular pelos vírions (partículas virais completas e infectantes), em até 72 horas ocorre a replicação primária viral no local de inoculação, que ocorre rapidamente devido às características do DNA que não dependem de componentes celulares hospedeiros para se replicar (BULLER, 2011).

Proteínas semelhantes ao fator de crescimento epidérmico são apontadas como supostamente precursoras da proliferação do tecido acometido e replicação do vírus pelo organismo, como o gene *T10*, responsável por codificar uma proteína expressa naturalmente

em grandes quantidades em células epiteliais do trato respiratório e trato digestivo superior. Segundo dados de Afonso et al. em 2004, um gene homólogo ao gene *T10* foi apontado como essencial para início e manutenção da patogênese na forma diftérica da enfermidade (AFONSO et al., 2000; LÜSCHOW et al., 2004).

2.6 Sinais Clínicos da Boubá Aviária

Em geral, os sinais clínicos são variáveis quanto à susceptibilidade do hospedeiro e ao patotipo da estirpe viral (RUPLEY, 1999).

A enfermidade, em sua apresentação cutânea tradicional, se manifesta através de lesões proliferativas semelhantes a papilomas nas partes desprovidas de penas nas aves, tais como bico, pálpebras, região das narinas, pernas e pés (Figura 3). Geralmente se inicia como um edema hiperêmico que eventualmente ulcera e dá origem a lesões hiperplásicas de aspecto nodular, persistindo até a cura espontânea da doença, onde ocorre o desprendimento do tecido afetado. Nos últimos estágios de desenvolvimento das lesões, devido à facilidade de traumas ou bicagem por outras aves oriundas do mesmo plantel, podem ocorrer hemorragias com frequência, permitindo a entrada de microorganismos oportunistas, facilitando a instalação de infecções secundárias que agravam a condição clínica da ave, aumentando o tempo de recuperação ou acarretando na morte das aves (VAN RIPER et al., 2007).

Em alguns casos, as lesões podem causar danos permanentes às áreas afetadas, incluindo perda de dedos dos pés, malformações de bico e face, além de cegueira (VAN RIPER & FORRESTER, 2007; VAN RIPER et al., 2002; FORRESTER & SPALDING, 2003).

Na forma diftérica da doença, é comum o aparecimento de lesões necróticas com aspecto úmido, que se desenvolvem nas membranas mucosas da boca e ao longo de todo o trato respiratório superior, promovendo discreta dificuldade respiratória e alimentar nas aves acometidas, aumentando consideravelmente os índices de mortalidade (VAN RIPER & FORRESTER, 2007; DAVIDSON et al., 1980).

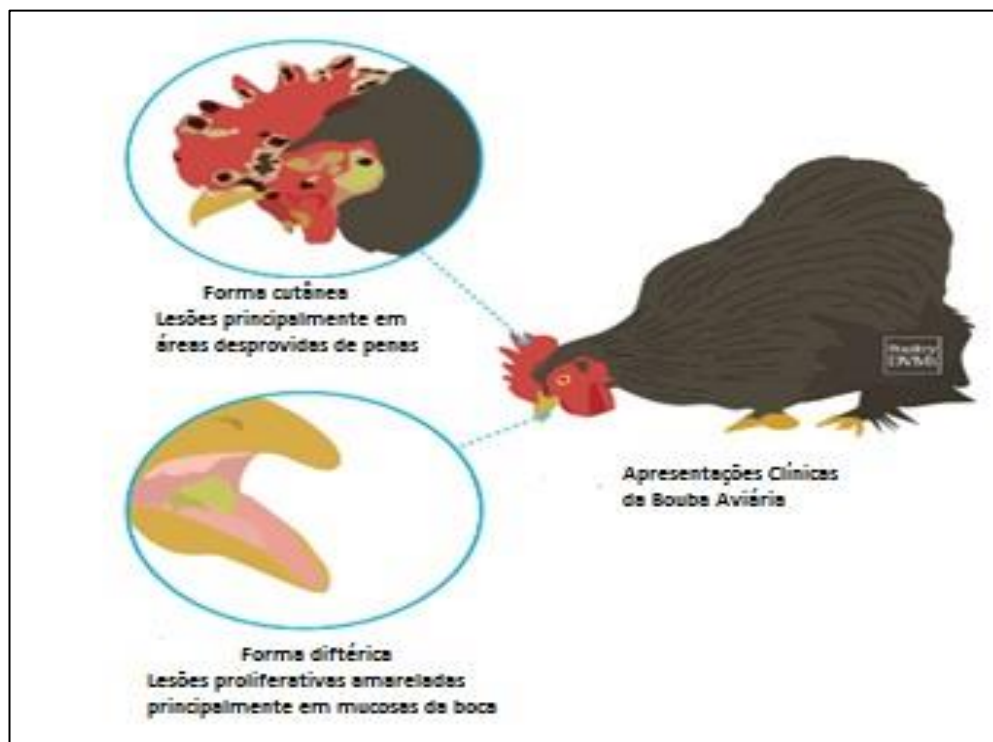


Figura 3: Representação das formas clínicas mais frequentes da Boubá Aviária em aves domésticas.
Fonte: Poultry DVM, 2021, com adaptações.

2.7 Papel de Culicídeos como vetores da Boubá Aviária

Os culicídeos (Diptera: Culicidae) são insetos que constituem um grupo de elevada biodiversidade, contemplando mais de 3500 espécies descritas em todo o mundo, com notável relevância vetorial de inúmeras enfermidades de interesse para a saúde pública e à sanidade animal, além de serem responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade associadas à transmissão de doenças (MEDEIROS-SOUZA et al., 2013; ALMEIDA, 2011).

O comportamento relativo à oviposição das fêmeas varia de acordo com o gênero, podendo apresentar desde ovos postos de forma conjunta ou individual nos criadouros (FORATTINI, 2002). Para maturação dos ovos já fecundados, existe a necessidade de repasto sanguíneo pela fêmea do inseto. Estas pousam sobre os hospedeiros de predileção e localizam, através dos órgãos sensoriais, o local para inserir o aparelho bucal do tipo picador-sugador para realizar a alimentação (LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, 1994). Após a realização do repasto sanguíneo, vírus do gênero *Avipoxvírus* podem permanecer por um período de até 14 dias de maneira viável na probóscide da fêmea, tornando-a um vetor mecânico eficiente para dispersão do agente (DAMASSA, 1966; ALLEY et al., 2010).

Uma fêmea adulta e reprodutivamente competente é capaz de executar até cinco ciclos reprodutivos em toda a sua vida, deslocando-se para longe de seu local de nascimento a fim de alcançar suas fontes alimentares, caso haja necessidade. Tal comportamento biológico reforça a necessidade de monitoramento de vetores em áreas onde ocorre a circulação de patógenos de importância médica e veterinária e seus vetores (CABRINI & ANDRADE, 2006).

Países subdesenvolvidos costumam ser mais afetados devido à variação da disponibilidade de serviços sanitários e pelas condições climáticas associadas às zonas tropicais e subtropicais, caracterizando uma maior facilidade para desenvolvimento e dispersão de vetores tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais (CLEMENTS, 1992).

Fatores bióticos, como a presença de hospedeiros susceptíveis e vegetação e os fatores abióticos, como precipitação, temperatura e umidade relativa do ar, são considerados o ponto chave da transmissão de doenças por mosquitos vetores. Essas condições podem afetar de maneira positiva ou negativa a proliferação do vetor em seu habitat, além da sua capacidade de transmitir doenças. (LAPUENTE et al., 2009; LAPUENTE et al., 2010).

Experimentalmente, a transmissão do vírus da Boubá Aviária vem sendo testada através de espécimes da subfamília Culicinae desde 1936, onde primeiros experimentos sugeriram o papel de vetoração após mosquitos recém-alimentados em aves apresentando sinais clínicos da enfermidade foram macerados e inoculados no epitélio escarificado de uma ave susceptível saudável, que após período de incubação foi capaz de demonstrar a mesma clínica de aves doentes (DAMASSA, 1965; BRODY, 1936).

2.8 Distinção entre mosquitos da subfamília Culicinae

Taxonomicamente, os culicídeos são pertencentes à Ordem Diptera, à família Culicidae, subfamília Culicinae, onde é alocado o subgênero *Culex*, alvo do objetivo do estudo. O gênero *Culex*, por sua vez, pertence à tribo Culicini, e é considerado o gênero mais abundante da família Culicidae, totalizando 26 subgêneros e um total de 763 espécies, sendo a diversidade de espécies dependente da localização geográfica (HARBACH, 2007; FORATTINI, 2002).

Alguns mosquitos são pertencentes a complexos, onde também podem ser denominadas espécies gêmeas, cuja diferenciação morfológica não é evidente, porém divergências reprodutivas podem ser observadas (ALMEIDA, 2011; WALTON et al., 2009). A identificação de espécimes adultos do subgênero *Culex* é dificultada em virtude das características macroscópicas indistinguíveis das fêmeas, cujas chaves de identificação são desatualizadas e pouco difundidas na literatura. Em geral, utilizam-se machos para realizar a diferenciação das espécies, devido às características distinguíveis do aparelho genital entre as

espécies, podendo servir como chaves dicotômicas (FORATTINI, 2002; DEMARI-SILVA et al., 2011).

O subgênero *Culex* alberga a maior parte de espécies dos Culicinae encontradas nas regiões subtropicais do planeta (ALMEIDA, 2011). Dois complexos pertencentes ao subgênero cuja relevância epidemiológica é claramente notável são o complexo Coronator, albergando espécies como *Cx. Coronator*, e *Cx usquatus*, além do complexo Pipens, onde *Cx. quinquefasciatus* (Figura 4), *Cx. pipens* e *Cx. nigripalpus* fazem parte da diversidade biológica que os compõem (DEMARI-SILVA et al., 2011).



Figura 4: Fêmea não alimentada de *Culex quinquefasciatus*. **Fonte:** Bryant, 2008.

2.9 Diagnóstico e monitoramento da Boubá Aviária

O diagnóstico da Boubá Aviária tem como padrão ouro a observação de alterações histopatológicas condizentes com hiperplasia de epitélio aliado à presença de inclusões citoplasmáticas eosinofílicas (Corpúsculos de Bollinger) e corpos de Borrel, além de hiperplasia e hipertrofia epitelial nas mucosas afetadas durante a apresentação clínica diftérica (TRIPATY & REED, 2013).

Devido a surtos de diversas enfermidades de interesse veterinário, vários grupos de estudo pelo planeta vêm buscando desenvolver novas técnicas de diagnóstico, além de elaborar medidas de prevenção e controle que sejam confiáveis e eficientes, a fim de marcar uma nova era de avanço tecnológico. Nesse contexto, técnicas de biologia molecular vêm ganhando espaço no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais, em destaque, a reação em cadeia da polimerase (PCR), por se demonstrar mais sensível e rápida (CAVALCANTI et al., 2008; YANG & ROTHMAN, 2004).

Técnicas de diagnóstico molecular estão sendo desenvolvidas e aprimoradas nos últimos anos a fim de detectar patógenos não somente em amostras de hospedeiros vertebrados, mas também em hospedeiros invertebrados como alguns artrópodes vetores de importantes arboviroses. Em trabalho desenvolvido por Chow et al. em 1998, foi relatada a relevância do monitoramento através de PCR com intuito de detectar a presença do vírus da dengue diretamente nos vetores, servindo como sistema de alerta para entender os mecanismos da enfermidade em determinadas situações (COSTA et al., 2009; CHOW et al., 1998).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

Todos os mosquitos foram capturados no município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro (22° 44' 38'' latitude sul; 43° 42' 27'' longitude oeste), no período de Junho de 2016 a Julho de 2017. Dois tipos de ambientes classificados como zonas rurais e um ambiente caracterizado como zona periurbana foram os pontos escolhidos para as capturas dos mosquitos, e suas características foram listadas na Tabela 1. Todos os pontos de captura possuíam criações do tipo subsistência de *Gallus gallus* e foram selecionadas em três bairros do município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro: São Miguel, Valão das Louças e Campo Lindo (Figura 5), sendo estes selecionados por conveniência.

O município de Seropédica encontra-se a 75 quilômetros do centro da capital do estado do Rio de Janeiro, ocupando uma área total de 283,634km², abrigando 86.743 habitantes segundo dados estimados de 2018 levantados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2017).

As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, pertencente ao Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública no Instituto de Veterinária.

Tabela 1. Locais de coleta identificados pelo bairro, concentração populacional de humanos, e classificação de zona em rural ou periurbana no município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Bairro	Densidade Populacional	Classificação (Zona)
São Miguel	Moderada	Rural
Valão das Louças	Baixa	Rural
Campo Lindo	Alta	Periurbana

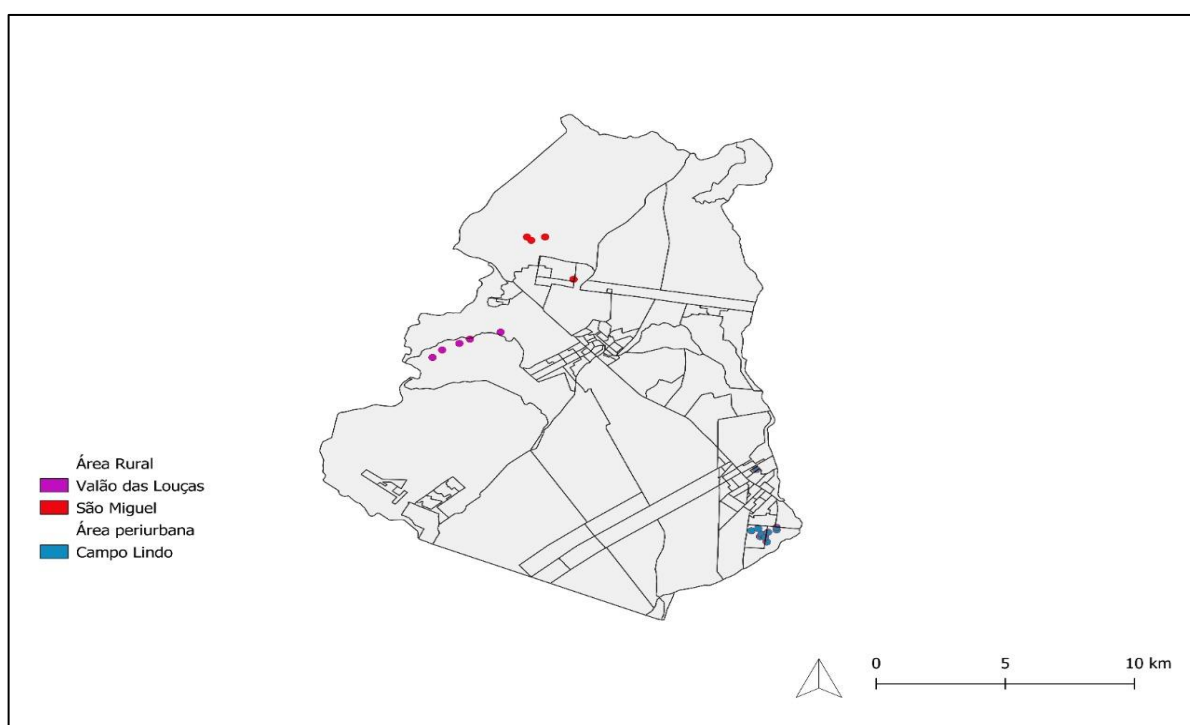


Figura 5: Localização geográfica do município de Seropédica, RJ e dos bairros onde foram realizadas as coletas de mosquitos: São Miguel, Valão das Louças e Campo Lindo.

3.2 Coleta de mosquitos e identificação morfológica

Para a determinação do tamanho amostral (n) foi levado em consideração parâmetros de uma população infinita com base em um nível de prevalência desejado (PEREIRA, 2005), baseando-se no erro amostral de 12%, grau de confiança de 95% e uma prevalência esperada de 50% de acordo com a fórmula: $n = p (100 - p) \cdot \alpha^2 / (d.p / 100)^2$, onde:

n = número de amostras para prevalência em uma população infinita;

p = prevalência esperada;

α^2 = fator do grau de confiança;

d = erro amostral.

Com os parâmetros adotados, obteve-se um número amostral de 267 mosquitos. No entanto, foram analisados um total de 300 fêmeas de mosquitos do gênero *Culex*. A captura de mosquitos foi realizada com a utilização de armadilhas CDC luminosas em áreas peridomiciliares, cujo funcionamento foi de 12 horas, três vezes por semana, totalizando 864 horas de funcionamento das armadilhas, compreendendo o período de julho de 2016 a julho de 2017. Todo procedimento de coleta foi autorizado pelos proprietários dos domicílios selecionados. As coordenadas geográficas relacionadas aos pontos de coleta dos mosquitos estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Coordenadas geográficas de latitude e longitude utilizadas para o georreferenciamento e confecção do mapa de Kernel dos pontos de captura de mosquitos realizada no período de Junho de 2016 a Julho de 2017 no município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Armadilha	Bairro	Zona	Longitude	Latitude
ARM 1	Campo Lindo	Periurbana	640047	7474650
ARM 2	Campo Lindo	Periurbana	639782	7474911
ARM 3	Campo Lindo	Periurbana	639843	7475029
ARM 4	Campo Lindo	Periurbana	639456	7475204
ARM 5	Campo Lindo	Periurbana	640091	7475124
ARM 6	Campo Lindo	Periurbana	640431	7475234
ARM 7	Campo Lindo	Periurbana	640431	7475360
ARM 8	Campo Lindo	Periurbana	639973	7474864
ARM 9	Campo Lindo	Periurbana	639720	7475314
ARM 10	Campo Lindo	Periurbana	639674	7478218
ARM 11	Valão das louças	Rural	628215	7484534
ARM 12	Valão das louças	Rural	629820	7485076
ARM 13	São Miguel	Rural	630885	7489753
ARM 14	São Miguel	Rural	631045	7489586
ARM 15	São Miguel	Rural	631585	7489750
ARM 16	São Miguel	Rural	632668	7487654
ARM 17	Valão das louças	Rural	627171	7483849
ARM 18	Valão das louças	Rural	628629	7484742

Tabela 2. Continuação.

Armadilha	Bairro	Zona	Longitude	Latitude
ARM 19	Valão das louças	Rural	627547	7484215

Todos os espécimes coletados foram levados vivos ao laboratório, e encaminhados para eutanásia através de refrigeração. Todos os mosquitos coletados passavam por uma avaliação morfológica com auxílio de um microscópio estereoscópico, onde características como sexo, estado alimentar e gênero do artrópode foram observadas, com base em chaves dicotômicas descritas na literatura (CONSOLI & OLIVEIRA, 1994; FORATTINI, 2002; BECKER et al., 2010; BERLIN & BELKIN, 1980).

Para esse estudo, somente fêmeas alimentadas identificadas como pertencentes ao gênero *Culex* foram selecionadas, em virtude da maior presença amostral oriunda das coletas realizadas durante o período, compreendendo um surpreendente número de 2175 fêmeas ingurgitadas, onde 300 foram previamente identificadas e selecionadas para análises moleculares subsequentes, de forma a conter metade de cada zona avaliada nesse estudo.

Os espécimes foram separados individualmente e alocados em tubos contendo solução de RNA later e foram estocadas a -20° C até o momento das análises moleculares.

3.3 Extração de material genético

A extração de DNA foi realizada individualmente em espécimes de mosquito do gênero *Culex*. Para a extração do DNA, foi utilizado o protocolo adaptado “Salting Out” de Ayres et al. (2002). Antes do início do protocolo de extração, cada uma das amostras armazenadas em RNAlater® foi descongelada gradualmente e os espécimes tiveram seus olhos dissecados e descartados, para que o restante do corpo fosse lavado três vezes com 500 μ L de PBS estéril e centrifugado a 14.500 rpm por 3 minutos, a fim de evitar possível ação inibitória nas análises moleculares por componentes pigmentares oriundos dos olhos dos insetos.

3.3.1 Salting Out

Para cada amostra foram adicionados 500 μ L de solução de lise (400mM NaCl; 10mM EDTA 20mM; Tris-HCL pH8; e 1% de SDS) além de 20 μ L de Proteinase K (150mg/ μ L). Os mosquitos foram macerados individualmente com ponteiros de 200 μ L com suas pontas queimadas e seladas para facilitar a ação da solução de lise utilizada no protocolo de extração. As amostras foram incubadas a 60 $^{\circ}$ C em estufa por um período de 18 horas (*overnight*). Após o período de incubação, 420 μ L de NaCl a 5M foi adicionado em cada uma das amostras processadas, seguida de homogeneização em vortex por 30 segundos e logo em sequência foram centrifugadas a 14.500 rpm por 20 minutos. Todo sobrenadante resultante foi transferido para novos tubos, onde um volume igual de isopropanol absoluto resfriado foi adicionado em cada uma das amostras. Os microtubos foram incubados a uma temperatura constante de -20° C durante uma hora, seguidas de centrifugação do material a 14.500 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi descartado, sendo adicionado em sequência 300 μ L de etanol 70%. As amostras foram novamente centrifugadas por cinco minutos e o sobrenadante foi descartado. A secagem ocorreu por inversão dos tubos com tampas abertas sobre superfície coberta e protegida.

Todas as amostras foram quantificadas por espectrofotometria Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), a fim de realizar uma padronização das amostras a 30ng/μL para subseqüentes análises moleculares.

3.4 Verificação da qualidade do DNA genômico através do gene constitutivo citocromo oxidase subunidade I (COI)

Todas as amostras quantificadas e analisadas quanto à pureza em espectrofotômetro seguiram para verificação da qualidade do DNA extraído através da confecção de uma reação em cadeia de polimerase (PCR) baseado no gene mitocondrial COI, considerado “*Barcoding*” para identificação de mosquitos (KUMAR et al., 2007). A reação de PCR foi realizada utilizando os oligoiniciadores CoI F (-5’GGATTTGGAAATTGATTAGTTCCTT-3’) e CoI R (-5’AAAAATTTTAATTCCAGTTGGAACAGC-3’). As reações foram desenvolvidas com volume final de 12,5μl, contendo 1x PCR tampão, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTPs, 0,5mM de cada primer e 1U Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen®). Em relação às condições de termociclagem para essa análise, foi especificado 94°C por 3 minutos a fim de atingir temperatura inicial de desnaturação, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos e extensão final de 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TAE 1x, com marcador de massa molecular DNA Ladder 1kb Plus (Invitrogen®). A corrida eletroforética em cuba horizontal foi padronizada com uma duração de 50 minutos a 75 volts.

Em seguida, os géis foram corados por imersão em brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta em fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia).

3.5 Ensaio de *Triplex* qPCR para detecção de fonte alimentar de *Culex* sp.

A identificação da fonte alimentar das fêmeas ingurgitadas utilizadas no estudo foi realizada através de ensaios qPCR HRM *Triplex* desenvolvido por Vilela (2019). As fontes alimentares avaliadas foram *Canis familiaris*, *Homo sapiens sapiens* e *Gallus gallus*.

O ensaio de qPCR HRM para a detecção simultânea da fonte alimentar de cada uma das fêmeas ingurgitadas testadas foram: 1x tampão Meltdoctor®, 4mM de oligoiniciadores sintetizados com alvo no gene *cyt b* de canídeos (*Canis familiaris*), 4mM de oligoiniciadores para humanos (*Homo sapiens sapiens*) e 0,6mM de oligoiniciadores de galináceos (*Gallus gallus*), como mostrado na Tabela 3. As condições de termociclagem foram, respectivamente, 95°C por 10 minutos, 95°C por 15 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos durante 40 ciclos, 72C ° por 10 minutos.

Tabela 3: Oligoiniciadores das espécies *Canis familiaris*, *Gallus gallus* e *Homo sapiens sapiens* detectadas através da reação de High Resolution Melting qPCR para distinção das fontes alimentares das fêmeas do gênero *Culex* utilizadas no estudo.

Espécie	Senso	Anti-senso	Pb	TM
<i>C. familiaris</i>	CCGGATCCAACAACCCTTCA	GGGTTTGCAGGGGTGTAGTT	175	~77,6°C
<i>G. gallus</i>	GGGACACCCTCCCCCTTAATGACA	GGAGGGCTGGAAGAAGGAGTG	266	~79,5°C
<i>H. sapiens</i>	AACTTCGGCTCACTCCTTGG	CCCGATGTGTAGGAAGAGGC	204	~82,5°C

3.6 Padronização de ensaio de PCR convencional para detecção de *Avipoxvírus* em *Culex* sp.

3.6.1 Seleção dos oligonucleotídeos iniciadores

Um par de oligonucleotídeos foi selecionado para detecção do gênero *Avipoxvírus* baseado na sequência do gene *p4b* que codifica a proteína do nucleocapsídeo viral como visto na Tabela 4. A PCR amplifica um produto de 578 pb para detecção do gênero *Avipoxvírus*. Estes *primers* são amplamente difundidos e utilizados para detecção molecular e diagnóstico de *Avipoxvírus* (BINNS et al., 1989; LEE & LEE, 1997).

Tabela 4: Oligoiniciadores selecionados para serem utilizados na PCR convencional para detecção de *Avipoxvírus* em fêmeas ingurgitadas do gênero *Culex*.

<i>Primers</i>	Sequência 5' → 3'	Fragmento	Referências
<i>p4b F</i>	CAGCAGGTGCTAAACAACAA	578 pb	Lee & Lee, 1997
<i>p4b R</i>	CGGTAGCTTAACGCCGAATA	578 pb	Lee & Lee, 1997

3.6.2 Obtenção dos controles positivos de *Avipoxvírus*

O controle positivo foi obtido a partir do DNA total extraído da vacina liofilizada Bouba Aviária Suave Biovet®. As alíquotas do conteúdo vacinal foram ressuspensas em Tampão Fosfato Salina Estéril 1x (PBS 1x) pH 7,2 e extraídas através do kit Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. Todas as alíquotas extraídas foram quantificadas por espectrofotometria Nanodrop® ND-2000 (Nanodrop Technologies, DE, USA), padronizadas em uma concentração de 30ng/μL de DNA total para as análises moleculares.

3.6.3 Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores

Esse ensaio foi realizado utilizando concentrações distintas dos *primers* selecionados para padronização da reação, a fim de verificar concentração dos *primers* que resulte no melhor limite de detecção e na ausência de reações inespecíficas. Os valores das concentrações de *primers* testados foram 0,4mM, 0,6mM e 0,8mM. A reação teve volume final 12μL, contendo: 1x PCR buffer (10mM Tris-HCl; pH=8,3; 50mM KCl) (Invitrogen®), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂ 50 mM, Invitrogen®), 0,2mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100mM Invitrogen®), valores distintos dos *primers*, 1,2U de Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®) e 1,5μL de DNA total dos controles positivos a 30ng/μL. As condições de termociclagem foram as seguintes: 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 60 segundos; 60°C por 30 segundos; 72°C por 60 segundos e a extensão final a 72°C por 2 minutos. Para avaliação em gel de agarose, foi utilizado marcador de massa molecular DNA Ladder 1kb Plus (Invitrogen®) para verificar o tamanho do produto amplificado. O gel foi corado por imersão em brometo de etídio e visualizado por fotodocumentador L-PIX Touch (Loccus Biotecnologia).

3.6.4 Limite de detecção do Ensaio de PCR convencional

O limite de detecção dos ensaios de PCR convencional para detecção do *Avipoxvírus* foi determinado de acordo com diluições decimais seriadas realizadas em triplicata das alíquotas extraídas do controle positivo. O número de cópias variou de 10⁶ (um milhão) a 10⁻¹ (zero) em oito diluições separadas realizadas para posterior avaliação. O volume final da reação foi de 12μL, contendo: 1x PCR buffer (10mM Tris-HCl; pH=8,3; 50mM KCl) (Invitrogen®), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂ 50 mM, Invitrogen®), 0,2mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100mM Invitrogen®), 0,8mM dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,2U de Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®) e 1,5μL

de DNA total a 30ng/μL. As condições de termociclagem e eletroforese foram as mesmas descritas no item 3.6.3.

3.6.5 Amplificação de *Avipoxvírus* pela PCR convencional

Após os testes de desempenho da PCR convencional a fim de se obter melhores condições para padronização da técnica, todas as amostras extraídas de fêmeas ingurgitadas foram analisadas para detecção do *Avipoxvírus* no aparelho ProFlex™ 96-well PCR System (ThermoFisher Scientific, MA, USA), com volume final da de 12μL, contendo: 1x PCR buffer (10mM Tris-HCl; pH=8,3; 50mM KCl) (Invitrogen®), 1,5mM de Cloreto de Magnésio (MgCl₂ 50 mM, Invitrogen®), 0,2mM de cada nucleotídeo (dATP, dGTP, dTTP e dCTP-100mM Invitrogen®), 0,4mM dos oligonucleotídeos iniciadores, 1,2U de Platinum *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen®) e 1,5μL de DNA total a 30ng/μL. As condições de termociclagem foram as mesmas descritas nas análises anteriores, seguidas de avaliação através de gel de agarose a 2%.

3.6.6 Purificação dos produtos de PCR convencional com alvo no gene *p4b*

Os produtos cuja amplificação ocorreu na altura esperada com alvo no gene *p4b* através dos ensaios de PCR convencional e observados em gel de eletroforese foram purificados a partir do Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega™) seguindo recomendações do fabricante para purificação de *amplicons* totais.

3.6.7 Sequenciamento e alinhamento das sequências

O sequenciamento das amostras positivas foi realizado na Rede de Plataformas Tecnológicas - Fiocruz VPPCB/RJ com a utilização do equipamento Sequenciador de DNA Applied Biosystems 3730XL de 96 capilares. As qualidades das sequências foram analisadas no software CLC Main Workbench Version 7.2 (Qiagen: CLC bio) através da avaliação do eletroesferograma. Os “*contigs*” foram montados no mesmo programa e a similaridade de cada sequência foi obtida através de uma busca inicial por meio da ferramenta BLAST disponível no endereço eletrônico <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>.

3.6.8 Análise Filogenética

As reconstruções filogenéticas foram realizadas usando um conjunto de dados contendo sequências do gene *pb4* obtidas neste estudo e um conjunto de dados de 347 sequências disponíveis no GenBank. Como grupo externo foram escolhidas sequências de *Squirrelpoxvírus* (NC0225631), *Cowpoxvírus* (LT9932261), *Sheeppoxvírus* (MN0726311) e *Goatpoxvírus* (MN0726231), também obtidas na base de dados do GenBank. As sequências foram alinhadas no software MAFFT com opções padrão e, em seguida, inspecionadas visualmente (KATO et al., 2017). Após a remoção de posições desalinhadas com GBlocks de acordo com Talavera & Castresana (2007), uma matriz de sequências curadas foi obtida. A inferência da filogenia de *Avipoxvírus* foi realizada utilizando o método de Máxima Verossimilhança (ML). Para determinação do melhor modelo de substituição foi utilizado o software JmodelTest implementado no MEGA7 (KUMAR et al., 2016). Os valores de *bootstrap* dos clados foram avaliados usando o critério de auto-convergência RaxML com os melhores valores de pseudo-réplicas (STAMATAKIS, 2014).

3.7 Construção do mapa de calor (Mapa de Kernel)

A análise espacial foi realizada através das coordenadas geográficas das armadilhas coletadas através do software Google Earth e o georreferenciamento foi realizado através do software Terraview 4.2. O mapa de Kernel foi construído com base em estudo anterior de

Senne et al. (2021) a fim de se determinar o comportamento de circulação de *Culex* sp. com DNA de *Avipoxvírus*, traçando a intensidade de espécimes considerados positivos em cada armadilha posicionada no mapa, a fim de se obter um panorama de intensidade nos bairros estudados do município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

3.8 Análise Estatística

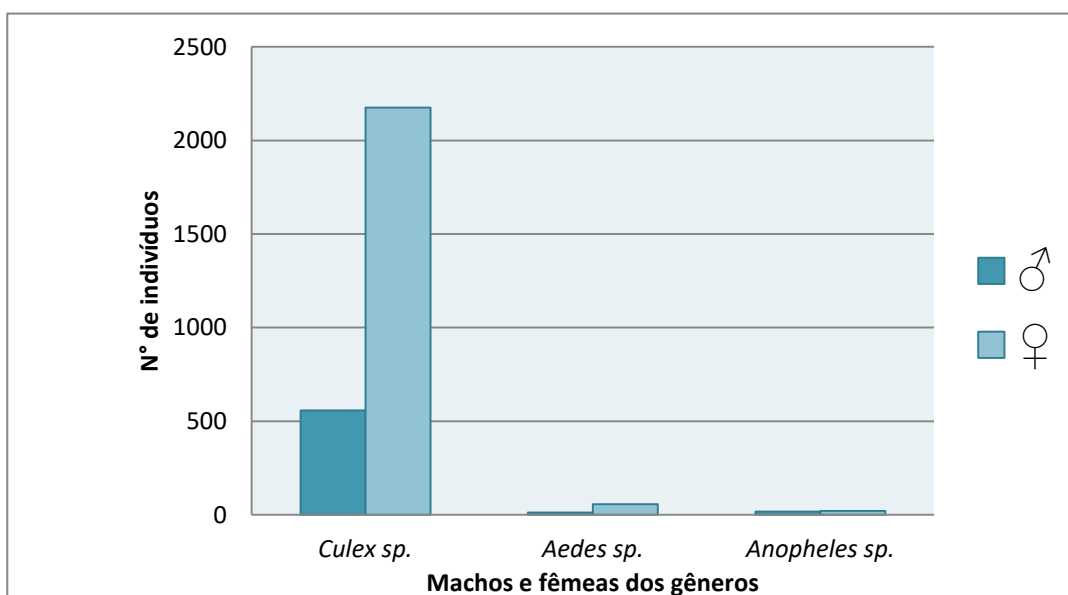
A frequência de *Avipoxvírus* em *Culex* sp capturados nos bairros de Campo Lindo, Valão das Louças e São Miguel no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro foi comparado através do teste de Qui-quadrado admitindo um erro de 5%.

4. RESULTADOS

4.1 Mosquitos coletados e identificação morfológica

Durante todo o período de coleta nos bairros de Campo Lindo, Valão das Louças e São Miguel no município de Seropédica, estado do Rio de Janeiro, entre agosto de 2016 a julho de 2017 foram coletados 2839 mosquitos, identificados como pertencentes aos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles*. Dos espécimes coletados, pertencentes ao gênero *Culex* (Figuras 7 a 8) compreenderam 96,23% (2732) do total, seguido de *Aedes* 2,46% (70) e *Anopheles* 1.30% (37), todos coletados em áreas rurais e periurbanas no município de Seropédica, Rio de Janeiro (Figura 6).

Figura 6: Número de machos e fêmeas de mosquitos dos gêneros *Culex*, *Aedes* e *Anopheles* coletados em áreas rurais e periurbanas no município de Seropédica, RJ.



Mosquitos do gênero *Aedes* e *Anopheles* foram identificados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) com base nos critérios de chaves dicotômicas presentes na literatura por Forattini (2002) e Berlin & Belkin (1969).



Figura 7: Espécime macho de *Culex* sp. clarificado com solução de Hidróxido de Potássio 10% observado através de lupa. Escala: 5 mm. **Fonte:** Arquivo pessoal.



Figura 8: Aparelho genital externo de espécimes fêmea (A) e macho (B) de *Culex* sp. clarificados com solução de Hidróxido de Potássio 10% observados através de lupa. Escala: 2,5 mm. **Fonte:** Arquivo pessoal.



Figura 9: Aparelho genital externo de macho identificado como pertencente à espécie *Culex quinquefasciatus* processado e montado em lamínula sobre lâmina, visto através de microscopia óptica com aumento de 100x. Escala: 0.2mm. **Fonte:** Arquivo pessoal.

4.2 Verificação da qualidade do DNA genômico através do gene constitutivo citocromo oxidase subunidade I (COI)

Seguidamente da extração de DNA fazendo uso da técnica “Salting out”, todas as amostras foram submetidas a um ensaio de PCR convencional com base no gene mitocondrial COI como marcador molecular, com a finalidade de verificar a qualidade do DNA total obtido após o protocolo de extração de DNA (Figura 10).

Todas as amostras que tiveram sua amplificação confirmada através do gel de agarose foram selecionadas para as análises de PCR convencional para consequente detecção de *Avipoxvírus*.

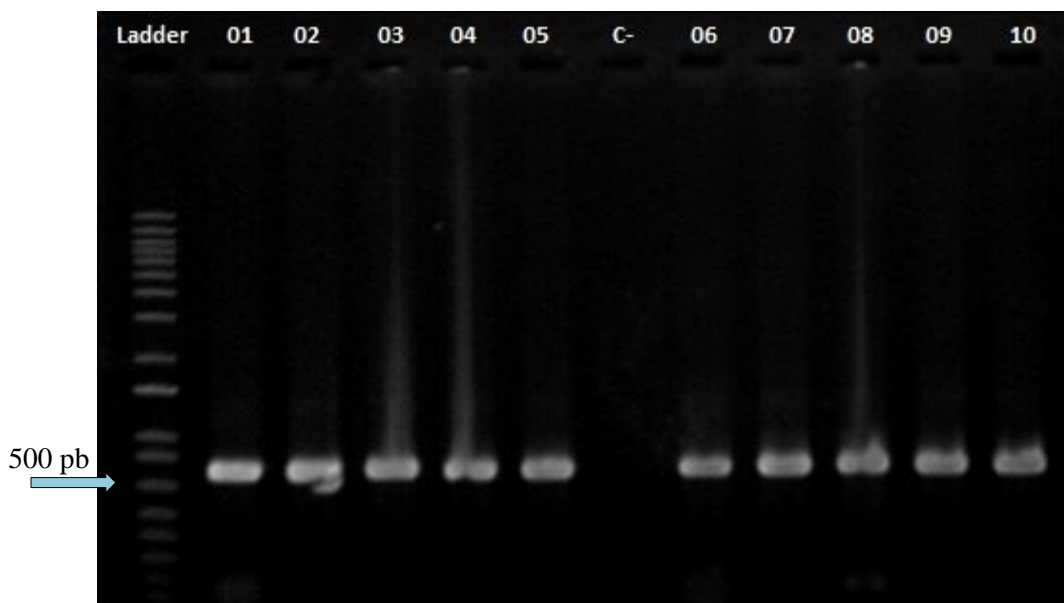


Figura 10: Gel de agarose 1,5% corado em brometo de etídio mostrando produtos de 678 pb amplificados em PCR convencional com alvo no gene constitutivo COI das amostras de DNA extraídas das fêmeas ingurgitadas de *Culex*. sp. Na ordem esquerda para direita: Padrão de Peso Molecular, Amostras 01, 02, 03, 04, 05, Controle negativo (C-), 06, 07, 08, 09 e 10.

4.3 Ensaio de *Triplex* qPCR para detecção de fonte alimentar de *Culex* sp.

Foram avaliadas as amostras individuais das fêmeas ingurgitadas avaliadas nesse estudo através do ensaio de PCR em tempo real padronizada por Vilela (2019) a fim de verificar a fonte alimentar. Os resultados desse ensaio mostram uma maior taxa de mosquitos alimentadas com sangue de *Gallus gallus* entre as três espécies testadas, compreendendo um total de 92% (276/300) dos mosquitos testados (Figura 11), sendo estes encontrados em sua maioria nas áreas rurais de coleta do município de Seropédica, Rio de Janeiro. Em segundo lugar, *Culex* sp. alimentados com sangue de *Homo sapiens sapiens*, com um total de 72% (216/300), seguido de 121/300 (40,3%) do total de espécimes alimentados com sangue de *Canis familiaris*.

As taxas de coalimentação puderam ser avaliadas (Figura 12) do total de fêmeas ingurgitadas pesquisadas, apresentando um total de 0,67% (2/300) de espécimes positivos para sangue de *Gallus gallus* e *Canis familiaris*, simultaneamente; 2,34% (7/300) de espécimes positivos para sangue de *Canis familiaris* e *Homo sapiens sapiens*, simultaneamente e 31,66% (95/300) para sangue de *Gallus gallus* e *Homo sapiens sapiens* simultaneamente. *Culex* sp. que se apresentaram positivos para todas as três fontes pesquisadas na análise molecular apresentaram a maior taxa de coalimentação, compreendendo 37% (111/300) dos espécimes testados.

Figura 11: Relação de fêmeas ingurgitadas de *Culex* sp. alimentadas com sangue das espécies *Canis familiaris*, *Homo sapiens sapiens* e *Gallus gallus* avaliadas através da técnica de *High Resolution Melting* qPCR.

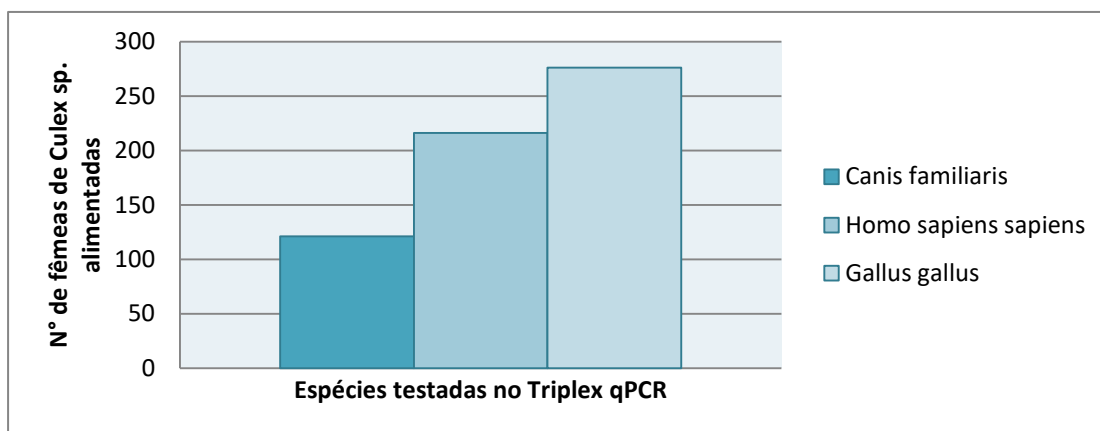
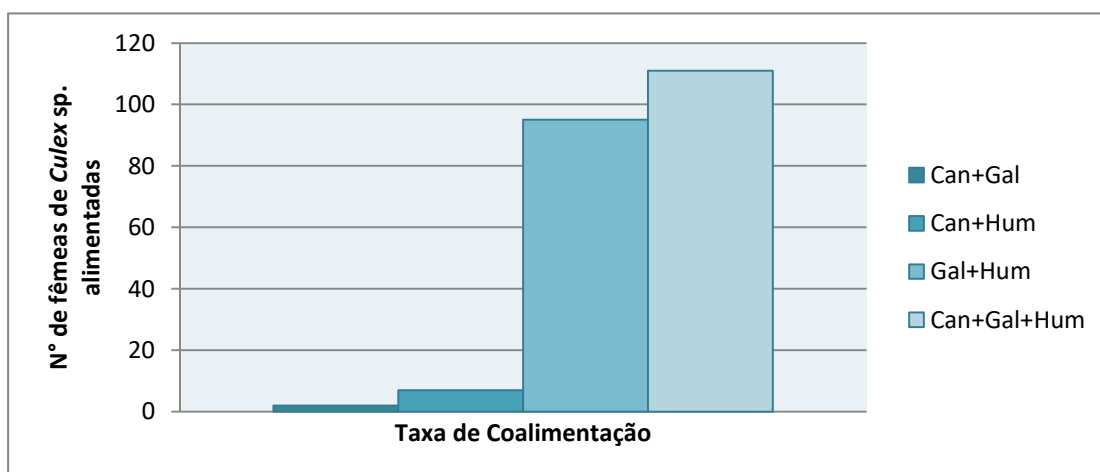


Figura 12: Taxas de coalimentação de fêmeas ingurgitadas de *Culex* sp. alimentadas com sangue das espécies *Canis familiaris*, *Homo sapiens sapiens* e *Gallus gallus* avaliadas através da técnica de *High Resolution Melting* qPCR.



4.4 Otimização da concentração de oligonucleotídeos iniciadores e ensaio de limite de detecção da PCR convencional com alvo no gene *p4b* de *Avipoxvírus*

A otimização da concentração dos primers utilizados no PCR convencional tendo como alvo o gene *p4b* foi realizada a fim de diminuir a quantidade de dímeros oriundos das ligações inespecíficas que ocorrem naturalmente durante a amplificação *in vitro* e também para a otimização do limite de detecção da técnica de PCR.

Como resultado, foi observado que a concentração de 0,4mM se mostrou suficiente e eficaz em amplificar número menor de cópias quando comparado às outras concentrações testadas durante os testes de Limite de Detecção realizados (Figuras 13 e 14).

O limite de detecção do PCR convencional utilizando como base protocolo modificado publicado por Lee & Lee (1987) para o *p4b* foi de 100 cópias de DNA genômico, mostrando-se capaz de ser reproduzido mesmo em amostras com poucos alvos, sendo visualizados facilmente em gel de agarose na altura de 578 pb após amplificação.

Esses resultados mostraram-se satisfatórios, porém, outros testes a fim de aprimorar ainda mais a detecção do patógeno em amostras com número menor de cópias foram realizados, sem melhores resultados.

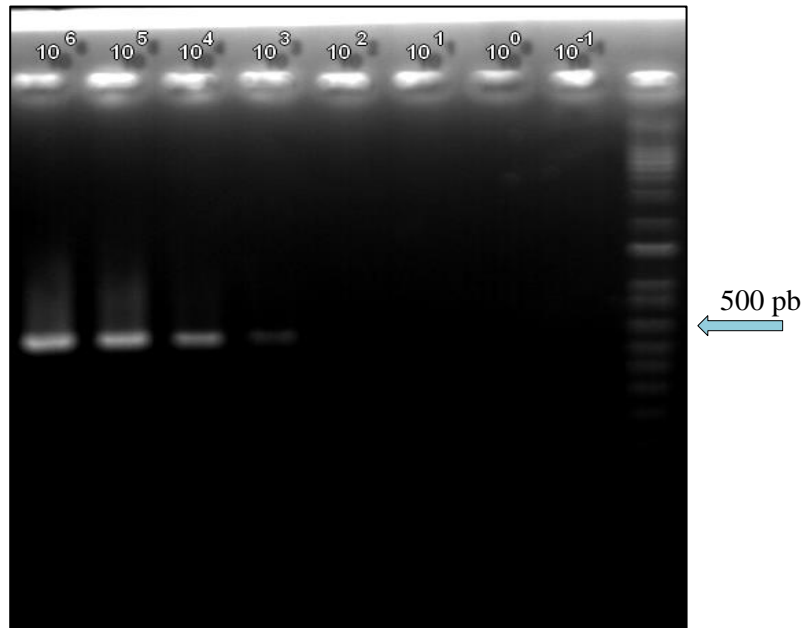


Figura 13: Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação do primeiro ensaio de limite de detecção utilizando concentração de 0,8mM de oligonucleotídeos iniciadores com alvo no gene *p4b* com diluições seriadas de material genético total oriundo de vacina comercial. Na ordem esquerda para direita: Diluição 10^6 , diluição 10^5 , diluição 10^4 , diluição 10^3 , diluição 10^2 , diluição 10^1 , diluição 10^0 e diluição 10^{-1} .

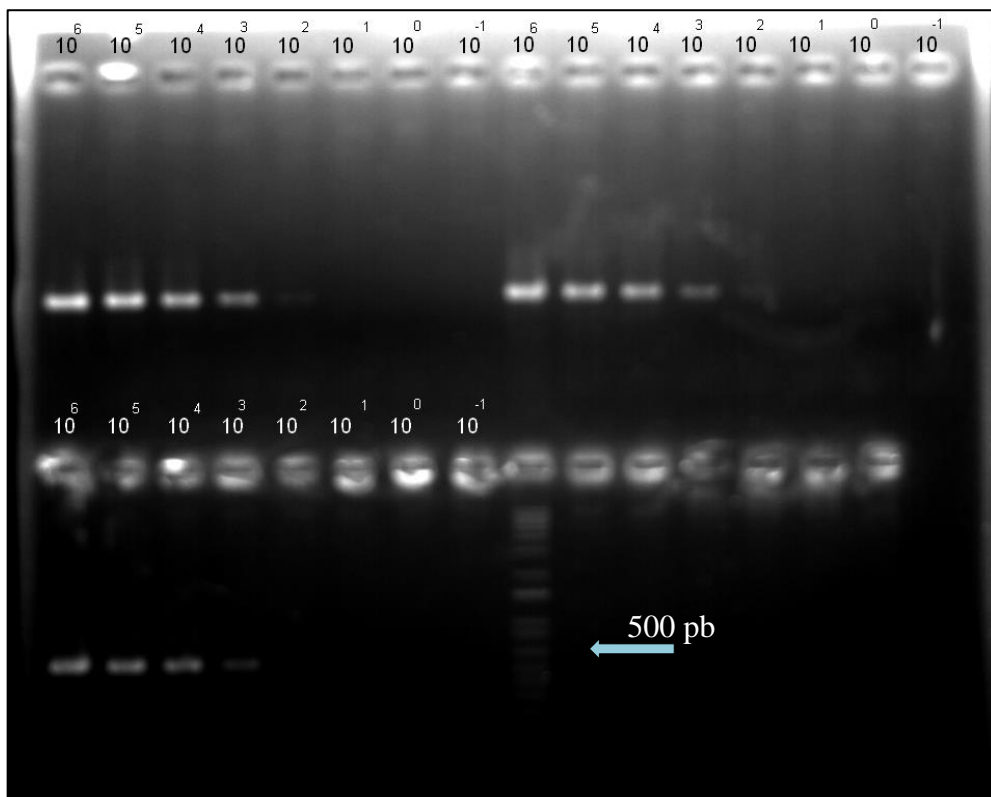


Figura 14: Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação do ensaio de limite de detecção juntamente com ensaio de concentração de oligonucleotídeos utilizando concentração de 0,4, 0,6 e 0,8mM de oligonucleotídeos iniciadores com alvo no gene *p4b* com diluições seriadas de material genético total oriundo de vacina comercial. Na ordem esquerda para direita fileira superior do gel: Concentração de 0,4mM em Diluição 10^6 , diluição 10^5 , diluição 10^4 ,

diluição 10^3 , diluição 10^2 , diluição 10^1 , diluição 10^0 e diluição 10^{-1} . Concentração de 0,6mM em Diluição 10^6 , diluição 10^5 , diluição 10^4 , diluição 10^3 , diluição 10^2 , diluição 10^1 , diluição 10^0 e diluição 10^{-1} . Fileira inferior do gel: Concentração de 0,8mM em Diluição 10^6 , diluição 10^5 , diluição 10^4 , diluição 10^3 , diluição 10^2 , diluição 10^1 , diluição 10^0 e diluição 10^{-1} .

4.5 Amplificação do gene *p4b* de *Avipoxvírus* pela PCR convencional

Para esse estudo, foram testadas amostras individuais de 300 fêmeas identificadas como pertencentes ao gênero *Culex* sp. sabidamente alimentadas com sangue de *Gallus gallus*. Do total de amostras avaliadas, 13,66% (41/300) foi considerado positivo para *Avipoxvírus*, conforme indicado no Anexo I e nas Figuras 15 a 17.

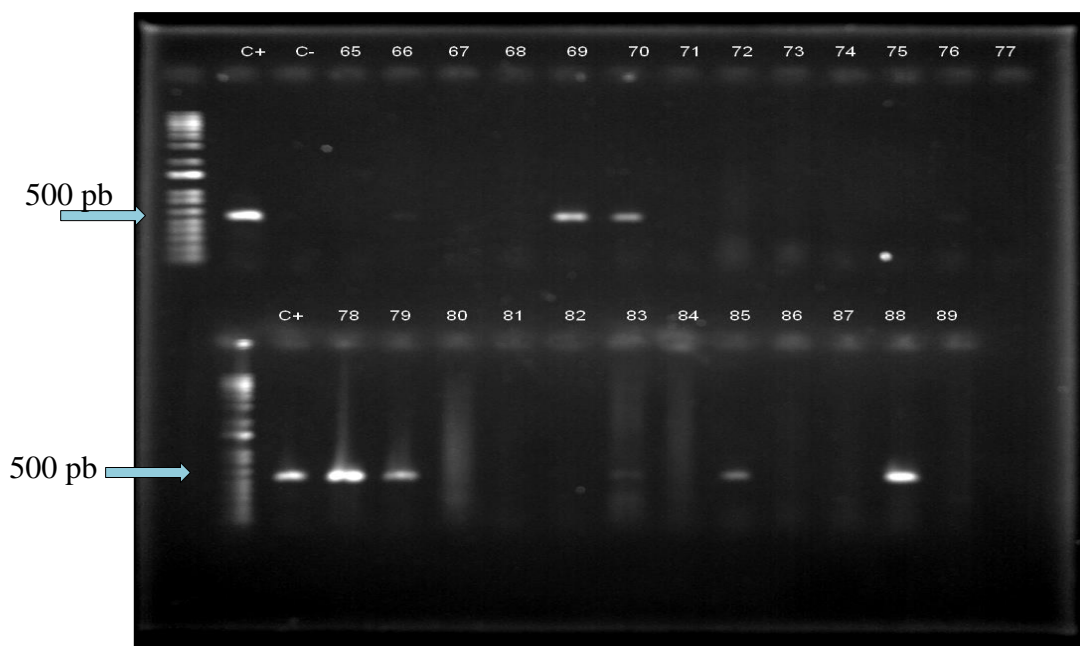


Figura 15: Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação da reação do dia 20/10/2020. Na ordem esquerda para direita fileira superior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poço 3 Controle Negativo (C-); Poço 5, amostra 66 positiva para *Avipoxvírus*; Poços 8 e 9, amostras 69 e 20, respectivamente positivas para *Avipoxvírus*. Poço 15, amostra 76 positiva. Poços 4, 6, 7, 10, 11, 12, 13, 14 e 16 amostras negativas. Fileira inferior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poços 3 e 4, amostras 78 e 79, respectivamente positivas para *Avipoxvírus*. Poço 8, amostra 83 positiva; Poço 10, amostra 85 positiva; Poço 13, amostra 88 positiva para *Avipoxvírus*. Poços 5, 6, 7, 9, 11, 12 e 14 compreendem amostras negativas.

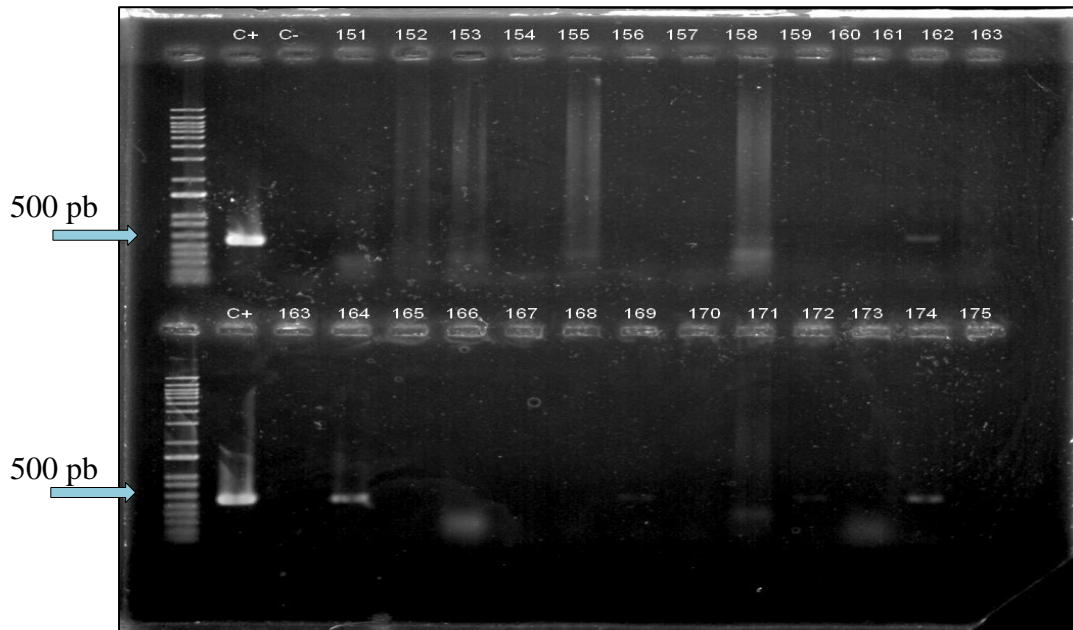


Figura 16: Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação da reação 1 do dia 28/10/2020. Na ordem esquerda para direita fileira superior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poço 3 Controle Negativo (C-); Poço 15, amostra 162 positiva para *Avipoxvírus*; Poços 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 e 16 amostras negativas. Fileira inferior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poço 13, amostra 185 positiva. Poço 15, amostra 187 positiva; Poços 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 14 amostras negativas. Fileira inferior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poços 4, amostra 164 positiva para *Avipoxvírus*; Poço 9, amostra 169 positiva; Poço 12, amostra 172 positiva; Poço 14 amostra 174 positiva para *Avipoxvírus*. Poços 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 13 e 15 compreendem amostras negativas.

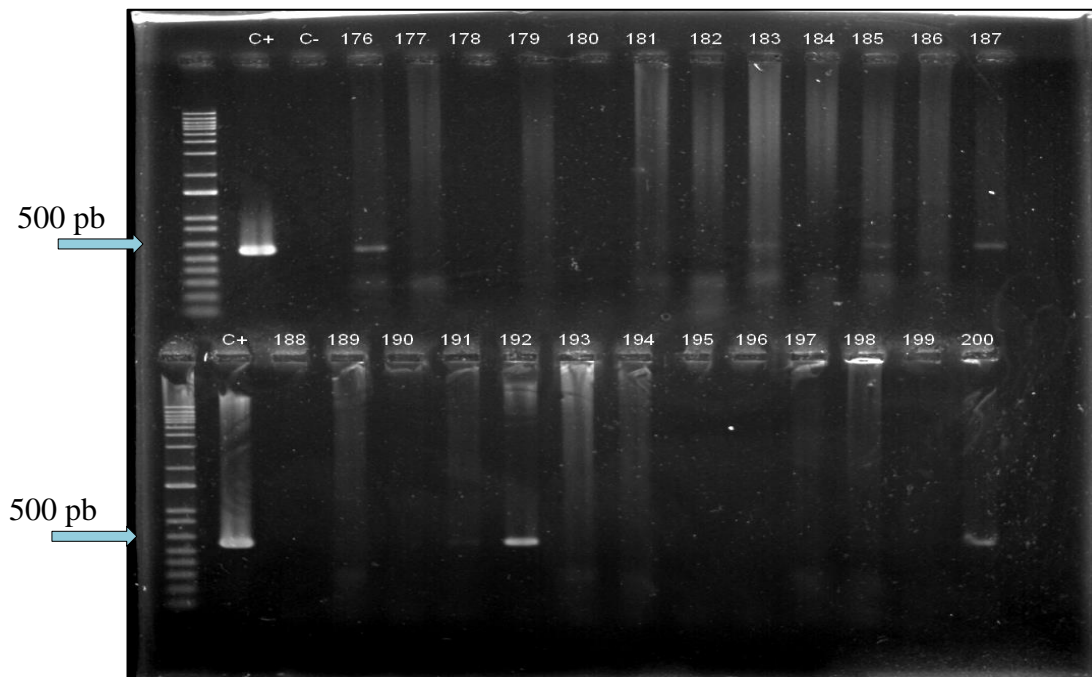


Figura 17: Gel de agarose 2% corado em brometo de etídio com produtos da amplificação da reação 2 do dia 28/10/2020. Na ordem esquerda para direita fileira superior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poço 3 Controle Negativo (C-); Poço 4, amostra 176

positiva para *Avipoxvírus*; Poço 11, amostra 183 positiva para *Avipoxvírus*. Poço 13, amostra 185 positiva. Poço 15, amostra 187 positiva; Poços 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 14 amostras negativas. Fileira inferior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poço 13, amostra 185 positiva. Poço 15, amostra 187 positiva; Poços 6, 7, 8, 9, 10, 12 e 14 amostras negativas. Fileira inferior do gel: Poço 1 Padrão de Peso Molecular; Poço 2 Controle Positivo (C+); Poços 6 e 7, amostra 191 e 192 respectivamente positivas para *Avipoxvírus*; Poço 15, amostra 200 positiva; Poços 3, 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14 compreendem amostras negativas.

Um total de 13,66% (41/300) das amostras individuais de fêmeas testadas nesse estudo apresentaram-se positivas na reação de detecção de *Avipoxvírus*, e sua distribuição espacial pode ser vista através do mapa de Kernel disposto na Figura 18.

Os mosquitos foram capturados em três bairros no município de Seropédica: Campo Lindo (área periurbana), Valão das Louças (área rural) e São Miguel (área rural). No bairro de Campo Lindo foram analisados para a presença de *Avipoxvírus* 154 *Culex* sp., em Valão das Louças foram analisados 50 e São Miguel 96. O percentual de *Culex* sp. positivos na PCR para *Avipoxvírus* em Campo Lindo foi de 13,63% (21/154), 12% (6/50) em Valão das Louças e 16,67% (16/96) em São Miguel (Tabela 5). Não houve diferença significativa na frequência de *Avipoxvírus* em *Culex* sp. entre os bairros analisados ($p > 0,05$).

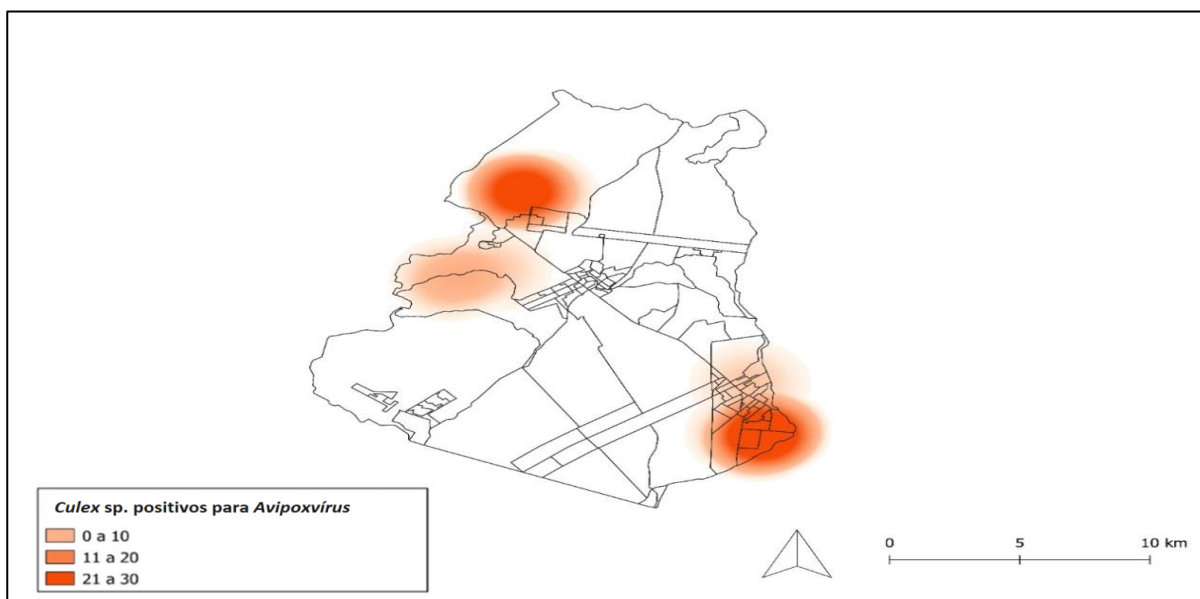


Figura 18: Mapa de Kernel demonstrando áreas de maior taxa de DNA por *Avipoxvírus* em *Culex* sp. avaliados no estudo. Áreas mais alaranjadas revelam locais de maior risco de ocorrência da Boubá Aviária.

Tabela 5: Relação das amostras positivas para *Avipoxvírus* em PCR convencional em relação ao bairro de coleta, tipo de zona e fonte alimentar.

Amostras positivas	Bairro	Zona	Fonte Al. Galináceos	Fonte Al. Humanos	Fonte Al. Cão
A45	Campo Lindo	Periurbana	+	-	-

Tabela 5 - Continuação

Amostras positivas	Bairro	Zona	Fonte Al. Galináceos	Fonte Al. Humanos	Fonte Al. Cão
A57	Campo Lindo	Periurbana	+	+	+
A69	São Miguel	Rural	+	+	-
A76	São Miguel	Rural	-	-	-
A78	Valão das Louças	Rural	+	+	+
A83	São Miguel	Rural	+	+	+
A85	Valão das Louças	Rural	-	+	+
A88	São Miguel	Rural	+	+	+
A94	Valão das Louças	Rural	+	+	+
A100	São Miguel	Rural	+	-	-
A139	Valão das Louças	Rural	+	-	-
A142	São Miguel	Rural	+	-	-
A144	Campo Lindo	Periurbana	+	+	+
A162	Campo Lindo	Periurbana	+	-	-
A164	Campo Lindo	Periurbana	+	+	+
A169	Campo Lindo	Periurbana	+	-	-
A172	Campo Lindo	Periurbana	-	+	+
A174	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A176	Valão das Louças	Rural	+	+	-
A183	Campo Lindo	Periurbana	+	-	-
A185	Campo Lindo	Periurbana	+	-	-

Tabela 5 – Continuação

Amostras positivas	Bairro	Zona	Fonte Al. Galináceos	Fonte Al. Humanos	Fonte Al. Cão
A191	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A192	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A200	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A204	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A208	Valão das Louças	Rural	+	-	-
A217	Campo Lindo	Periurbana	+	-	-
A220	São Miguel	Rural	+	-	-
A221	Campo Lindo	Periurbana	+	-	-
A226	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A227	São Miguel	Rural	+	+	-
A228	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A240	São Miguel	Rural	+	+	-
A244	São Miguel	Rural	+	-	-
A249	São Miguel	Rural	+	+	+
A261	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A262	São Miguel	Rural	+	+	-
A283	São Miguel	Rural	+	+	-
A286	Campo Lindo	Periurbana	+	+	-
A296	São Miguel	Rural	+	+	+

4.6 Análise do Sequenciamento de Amostras positivas para *Avipoxvírus*

Para melhor estabelecer a identidade e a filogenia dos *Avipoxvírus* obtidos de *Culex* sp., o gene *pb4* foi sequenciado e analisado através da ferramenta BLASTn. Um total de 15 amostras (seis positivas em Campo Lindo, seis positivas em Valão das Louças e três positivas em São Miguel) foram selecionadas conforme o padrão de banda apresentado após a amplificação pela PCR com alvo no gene *p4b*, a fim de garantir a qualidade do sequenciamento, além de maior representatividade das regiões de coleta desse estudo. Entretanto, cinco amostras enviadas para sequenciamento não demonstraram boa qualidade, e, portanto, foram retiradas da análise filogenética. As dez sequências utilizadas nesse estudo compreenderam cinco amostras oriundas do bairro de Valão das Louças (A78, A85, A94, A176 e A208) e cinco amostras do bairro Campo Lindo (A57, A69, A45, A192 e A187), e foram alinhadas e comparadas a outras sequências disponíveis no GenBank, tendo como base a análise inicial realizada por Gyuranecz et al. (2013), Jarmin et al. (2006) e Manarolla et al. (2010) para reconstrução da árvore filogenética baseada no gene *pb4*. A análise contou com 347 sequências disponíveis no GenBank (Anexo 2) com base no método de máxima verossimilhança e demonstrou a presença de dois cladogramas, agrupando os subclados A1 a A7 e B1 a B3. Os grupos externos utilizados nesse estudo compreenderam sequências de *Squirrelpoxvírus*, *Cowpoxvírus*, *Sheeppoxvírus* e *Goatpoxvírus*. A construção da árvore definitiva (Figura 19) foi baseada no estudo realizado por Chacón et al. (2020), onde 53 sequências disponíveis no GenBank pertencentes aos subclados A1 ao A7, B1 ao B3 e ao clado C foram comparadas às amostras isoladas neste estudo (Figura 19).

O sequenciamento das amostras selecionadas neste trabalho tendo como alvo o gene *pb4* resultou em identidade de 99% para *Fowlpoxvírus* em 100% das amostras avaliadas, sendo todas estas agrupadas dentro do clado A, subclado A1, assim como diversas outras sequências globais analisadas e isoladas de aves (Estados Unidos, Brasil, Áustria, Canadá, China, Hungria, Alemanha, Tanzânia, Irã, Hungria, Itália, Egito, Iraque e Reino Unido).

A distância evolutiva média global do gene *p4b* de *Avipoxvírus* foi de $0,0048 \pm 0,0014$ na região estudada. A distância evolutiva entre as sequências de *Avipoxvírus* de mosquitos coletados em áreas rurais e periurbanas foi de $0,0047 \pm 0,0013$. Quando a distância evolutiva foi comparada dentro de cada área avaliada, observou-se na área rural um valor de $0,0061 \pm 0,0021$ e na área periurbana um valor de $0,0038 \pm 0,0016$ (Tabela 6).

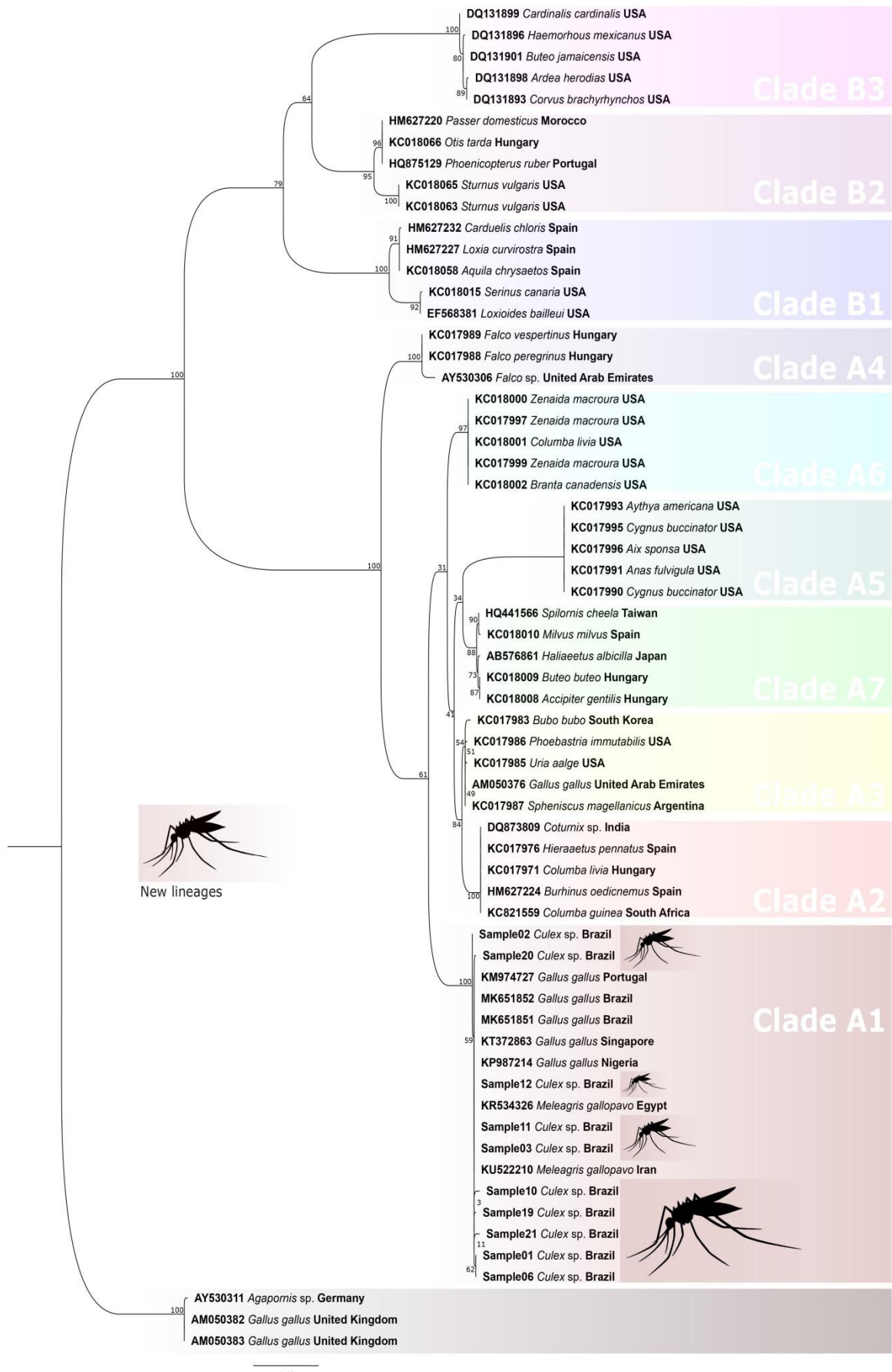


Figura 19: Árvore filogenética derivada das sequências do gene *p4b* isolados nesse estudo. Os grupos externos compreenderam sequências de *Squirrelpoxvirus*, *Cowpoxvirus*, *Sheeppoxvirus* e *Goatpoxvirus*. Escala indica número de substituições de nucleotídeos *per site*.

Tabela 6 - Distância evolutiva entre sequências do gene *p4b* que codifica para proteína do nucleocapsídeo de *Avipoxvírus* obtidos das amostras de *Culex* sp. no município de Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Amostra n01-1s (A78) VL									
Amostra n02-1s (A85) VL	0.0038								
Amostra n03-1s (A94) VL	0.0019	0.0019							
Amostra n10-2s (A57) CL	0.0076	0.0076	0.0057						
Amostra n11-2s (A69) CL	0.0019	0.0019	0.0000	0.0057					
Amostra n12-2s (A45) CL	0.0019	0.0019	0.0000	0.0057	0.0000				
Amostra n16-2s (A192) CL	0.0000	0.0038	0.0019	0.0076	0.0019	0.0019			
Amostra n19-2s (A187) CL	0.0038	0.0038	0.0019	0.0076	0.0019	0.0019	0.0038		
Amostra n20-2s (A176) VL	0.0038	0.0038	0.0019	0.0076	0.0019	0.0019	0.0038	0.0038	
Amostra n21-2s (A208) VL	0.0115	0.0115	0.0095	0.0154	0.0095	0.0095	0.0115	0.0115	0.0115

5. DISCUSSÃO

De um modo geral, são grandes as diferenças estruturais entre os bairros estudados no que se diz respeito às condições geográficas. São Miguel e Valão das Louças correspondem áreas de mata preservada, além de possuírem grande variedade da fauna silvestre. Já a região de Campo Lindo compreende uma área de pouca vegetação, elevada antropização e, por consequência, pouca atividade de aves silvestres que podem estar servindo como reservatórios (SAIF, E. & EL-BALLAL, S. S., 1997).

Nesse estudo, a técnica de “*High Resolution Melting*” qPCR para detecção da fonte alimentar se mostrou eficaz e pôde ser realizada em intervalos longos após a coleta dos mosquitos e consequente extração do material genético. Em relação à avaliação da preferência alimentar analisada através da técnica, a maioria das fêmeas de *Culex* sp. coletadas foram consideradas positivas para sangue de galináceos; em segundo lugar, positivas para sangue de humanos, e por último, sangue de canídeos. Estes dados corroboram com os resultados obtidos com diversos autores na literatura que potencializam a predileção ornitofílica de mosquitos classificados no gênero *Culex* (FORATTINI, 2002; DEMARI-SILVA et al., 2011; REJON et al., 2018). Como não foi possível realizar a identificação morfológica dos espécimes de *Culex* sp. a nível de espécie, não é possível fazer correlações aprofundadas acerca das preferências alimentares a nível de espécie de culicídeos. Mudanças no padrão de comportamento alimentar de *Culex* sp. que se alimentaram de sangue humano podem ser explicadas pelos processos de invasão humana nas áreas de vegetação mais densa, o que teria facilitado o aumento da quantidade de dípteros na região, além de inferir na adaptação do vetor em áreas urbanas e periurbanas (FORATTINI, 2002). O sangue de canídeos foi testado a fim de elucidar a relação próxima com humanos, o que pode favorecer o vetor a realizar repasto sanguíneo nessa espécie (*C. familiaris*) na ausência da espécie de preferência.

A correlação de dados referentes ao repasto sanguíneo de potenciais vetores como mosquitos pertencentes ao gênero *Culex* é fundamental para melhor elucidar o papel desses vetores na transmissão de patógenos de interesse veterinário como o *Avipoxvírus*, além de aprimorar a abordagem de esquemas de medidas estratégicas para profilaxia e controle da enfermidade (GOODMAN, 2018; FORATTINI, 2002). Nesse estudo, dados correlacionando fonte alimentar como sangue de outros grandes grupos de aves não foram avaliados, desta forma, quaisquer dados relacionados à correlação de positividade com a fonte alimentar *Gallus gallus* são tendenciosos, servindo nesse estudo, portanto, como norte das reações de detecção de *Avipoxvírus*.

Diversas regiões do genoma dos *Avipoxvírus* foram estudadas para confecção de *primers* que pudessem ser abrangentes a fim de realizar um melhor agrupamento e classificação filogenética, entretanto, *primers* desenvolvidos baseados nos genes *fpv140*, gene *cnpv113* e *cnpv114* foram incapazes de diferenciar clados e subclados em relação aos hospedeiros que foram identificados com o sequenciamento realizado no gene *p4b* (GYUNARECZ et al., 2013; JARMIN et al., 2006; MANAROLLA, et al. 2010). A fim de estabelecer uma melhor classificação e reconstrução da árvore filogenética através de 111 isolados de aves de diferentes regiões do mundo, Gyunarecz et al. (2013) utilizaram sequências de ambas as regiões da DNA polimerase e região 4b do core da proteína viral, que providenciaram alinhamentos bastante semelhantes quando comparados simultaneamente. É imprescindível ressaltar que os oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesse estudo são capazes de amplificar uma região comum a todos os *Avipoxvírus*. (GYUNARECZ et al., 2013; BINNS et al., 1989). Portanto, a detecção de *Avipoxvírus* nos quatro mosquitos cujo sangue de galináceos não foi detectado em técnica anterior à pesquisa do patógeno, pode ser explicada pelo repasto sanguíneo realizado em outras espécies de aves infectadas da região. Uma segunda hipótese estaria fundamentada na capacidade de replicação viral em estruturas

do aparelho digestivo do próprio díptero, modificando seu papel de vetor mecânico para vetor biológico relacionado à enfermidade.

Nesse estudo, 13,66% das amostras testadas (41/300) demonstraram positividade para *Avipoxvírus*. Tal fato corrobora com o visto por Yeo et al. em 2019, que observaram positividade de 2,60% (4/154) em *pools* de mosquitos coletados em áreas onde ocorreram surtos de Boubá Aviária em Singapura, mostrando que a detecção em potenciais vetores é possível de ser realizada, podendo se tornar uma ferramenta importante de monitoramento da circulação do patógeno em áreas onde a ocorrência da enfermidade pode aumentar devido a fatores climáticos, além de maiores esclarecimentos acerca da biologia dos vetores envolvidos e medidas estratégicas de controle de vetores de interesse veterinário (YEO et al., 2019; REJON et al., 2018).

Diferente de Yeo et al. (2019) e Lee et al. (2017), as testagens em fêmeas ingurgitadas nesse presente estudo não foram realizadas em áreas onde sabidamente ocorriam surtos de Boubá Aviária, e nenhum caso da doença foi observado ou registrado através de sintomatologia clínica apresentada por aves ou relatado nos pontos de coleta pelos proprietários, embora tenha sido detectada a presença do agente etiológico em considerável parcela das fêmeas ingurgitadas de *Culex* sp. coletadas. Diante disso, fortalecemos a ideia de DaMassa, que em 1966 realizou estudo experimental que demonstrou a persistência de partículas virais estáveis e infectantes de *Avipoxvírus* por mais de 14 dias no interior da probóscide do vetor, sendo capaz de ser transmitido a hospedeiros susceptíveis. É importante ressaltar que a positividade presente nesse estudo pode ter sido influenciada por outras espécies de aves que habitam a região, justificando também a ausência de manifestação clínica em galináceos oriundos das regiões de coleta. Nesse trabalho, embora não tenham sido realizadas análises experimentais para confirmação do potencial de vetorização das fêmeas selecionadas, a simples detecção através de técnicas moleculares realizadas para identificação do agente etiológico já permitem a associação do mosquito como possível transmissor do vírus, como relatado na literatura (YEO et al. 2019; DAMASSA, 1966).

Embora estudos de Yeo et al. (2019) e Lee et al. (2017) tenham selecionado *pools* de mosquitos para realizar as análises moleculares, a detecção de *Avipoxvírus* em culicídeos realizada nesse estudo foi realizada de forma individualizada. A amostragem individual mostrou-se suficiente em relação à quantidade total de DNA após realizada a técnica de extração modificada de Ayres et al. (2002), demonstrada pela quantificação através de espectrofotometria e também através da verificação da qualidade do DNA genômico tendo como alvo o gene mitocondrial COI, que demonstrou boa qualidade de banda na altura esperada (AYRES et al., 2002). Este protocolo de extração de DNA total foi selecionado devido à eficiência de extração com qualidade e quantidade excepcional de DNA e excelente custo-benefício, anteriormente analisados e comparados pelo grupo de estudos do Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) em trabalhos não publicados.

Relatos na literatura cujo objetivo foi a detecção de *Avipoxvírus* em mosquitos são raros, mesmo após a popularização de ferramentas moleculares importantes como o PCR e o sequenciamento genético. Desta forma, sugerimos que o vírus pode permanecer na probóscide e parte das peças bucais do mosquito, e que a sensibilidade das ferramentas moleculares pode diminuir devido à degradação do DNA ocasionada pela digestão do sangue do hospedeiro no vetor, impedindo sua detecção caso a técnica não seja realizada de forma a preservar a probóscide do mosquito. DaMassa (1966) em seus estudos experimentais, sugeriu que o mecanismo de transmissão de *Fowlpoxvírus* por *Culex tarsalis* é extrínseco, sem envolver multiplicação viral dentro do vetor, e que a possibilidade de infecção permanece por aproximadamente duas semanas após ingestão de sangue de aves sabidamente infectadas. Esses dados podem explicar poucos relatos na literatura que envolveram detecção de *Avipoxvírus* por ferramentas moleculares em *Culex* sp.

A análise filogenética do gene *p4b* nesse estudo demonstrou de forma consistente a identificação e agrupamento das dez sequências avaliadas entre o subgrupo A1, dentro do clado A, correspondentes aos *Fowlpoxvirus*. Estes resultados já eram esperados, devido ao clado A agrupar principalmente sequências oriundas de amostras de galináceos, com grande distribuição geográfica ao redor do mundo em análises realizadas por publicações referências de estudos globais como a de Gyuranecz et al. (2013), e principalmente por ter resultado fidedigno com relação à testagem para detecção de sangue de galináceos nas amostras de *Culex* sp. utilizadas neste estudo (GYURANECZ et al., 2013.; JARMIN et al., 2006; MANAROLLA et al., 2010).

Em estudo anterior de Jarmin et al. (2006), sugeriram a classificação de três cladogramas genéticos distintos a partir do sequenciamento utilizando fragmentos amplificados de *primers* propostos por Lee & Lee em 1997, mundialmente utilizados para diagnóstico de *Avipoxvirus* e baseados no gene *p4b* que codifica para proteína do nucleocapsídeo. Na nova classificação proposta pelo grupo, o clado A abriga os *Fowlpoxvirus*, o clado B os *Canarypoxvirus* e o C os *Psittacinepoxvirus* (JARMIN et al., 2006; LEE & LEE, 1997).

Slocombe et al. (2013), analisaram sequências oriundas da detecção de *Avipoxvirus* através de oligonucleotídeos iniciadores distintos dos propostos por Lee & Lee em 1997 de lesões de duas aves rosela vermelha (*Platycercus elegans*), que não se assemelhava a nenhum *poxvirus* aviário descrito na literatura; desta forma, um novo clado D de *Avipoxvirus* foi proposto, e associado somente à ave da região estudada. (SLOCOMBE et al., 2013).

Relatos mais recentes para classificação e agrupamento de *Avipoxvirus* ao redor do mundo, segregam cinco grandes cladogramas, com grande número de subclados relatados (MANAROLLA et al. 2010; MAPACO et al., 2016, 2018). Seguindo essa nomenclatura e classificação, foi possível observar que os isolados oriundos desse estudo, quando comparados com as sequências disponíveis no GenBank datadas no Anexo II, foram capazes de se inserir de forma robusta no clado A, subclado A1. Outros isolados de aves oriundas dos Estados Unidos, Brasil, Áustria, Canadá, China, Hungria, Alemanha, Tanzânia, Irã, Hungria, Itália, Egito, Iraque e Reino Unido também foram agrupadas nesse subclado. Também foi possível observar que os hospedeiros da ordem dos Galliformes foram majoritariamente subagrupados no subclado A1, de forma similar a resultados publicados por Gyuranecz et al., (2013), Jarmin et al., (2006) e Manarolla et al., (2010). Nesse estudo, não foi observado especificidade no processo de infecção em função do hospedeiro, conforme sugerido por Gyuranecz et al. (2013), que relataram uma grande diversidade de espécies hospedeiras em suas análises.

O grande número de sequências disponíveis no GenBank (347 sequências) utilizadas para comparação e confecção da árvore filogenética inicial e consequente análise filogenética das sequências isoladas nesse estudo foi delimitada em virtude da baixa divergência genética encontrada no gene *p4b*, que facilmente pode interferir na delimitação das espécies. (GYURANECZ et al., 2013). Tal fato demonstra a importância de se utilizar a maior quantidade possível de dados informativos para a identificação eficaz das espécies de *Avipoxvirus*.

Quanto às distâncias evolutivas calculadas, embora o bairro de Campo Lindo ter liderado as taxas de amostras consideradas positivas para *Avipoxvirus* com um total de 7% (21/300) de todas as amostras testadas, a maior distância evolutiva do gene *p4b* de *Avipoxvirus* das amostras sequenciadas foi observada nas amostras oriundas de áreas rurais (Valão das Louças) quando comparada à região periurbana de Campo Lindo. Embora tal fato possa mostrar a relação de adaptação do vetor em áreas altamente antropizadas, sugere-se que áreas onde a antropização é menor, maiores divergências genéticas estariam associadas devido a maior interação e abundância de espécies de hospedeiros encontradas nessas regiões. Giraudeau et al. (2014) demonstraram pela primeira vez que as maiores taxas de infecção por

Avipoxvírus em tentilhões (*Haemorrhous mexicanus*) foram em áreas urbanas, onde as atividades antrópicas eram mais presentes.

De fato, pela primeira vez no Brasil, foi possível reportar a presença do subclado A1 em amostras oriundas de *Culex* sp. contendo DNA de *Avipoxvírus*, ressaltando sua importância vetorial e prejuízos econômicos associados à criação do tipo subsistência no Brasil.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho, a mais frequente fonte de repasto sanguíneo por dípteros do gênero *Culex* sp. compreendeu galináceos, sendo esses, por sua vez, mais frequentes nos bairros rurais, com vegetação mais densa e pouca intervenção humana.

Foi possível o desenvolvimento de uma técnica de PCR convencional eficaz e sensível para detecção de *Avipoxvírus* diretamente em mosquitos pertencentes ao gênero *Culex* sp., técnica esta reproduzida pela primeira vez em território brasileiro.

As divergências genéticas entre sequências isoladas de áreas rurais, nesse estudo, se mostraram maiores do que sequências isoladas das áreas periurbanas do município de Seropédica, Rio de Janeiro.

Pela primeira vez no Brasil, a presença do subclado A1 foi relatada em amostras oriundas de *Culex* sp. contendo DNA de *Avipoxvírus*, confirmando o potencial de vetoração dos Culicídeos.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção do *Avipoxvírus* em mosquitos do gênero *Culex* sp. de importância médica veterinária comprova a circulação do agente etiológico e de potenciais vetores no município de Seropédica. Esse estudo é pioneiro em detecção de Poxvírus Aviário diretamente em potenciais vetores no Brasil, e pode contribuir intensamente com a literatura para complementação de dados referentes à biologia do vetor e melhoria das técnicas de monitoramento e de controle da Boubá Aviária no Estado do Rio de Janeiro.

A presença de aves domésticas na região devido às criações do tipo subsistência influencia a manutenção da densidade de dípteros do gênero, favorecendo surtos e contribuindo para a permanência da enfermidade na região estudada.

A padronização de uma técnica de detecção de *Avipoxvírus* diretamente em vetores mostrou-se eficiente em amostras com valores baixos de material genético viral, podendo ser utilizada para estudos de monitoramento e de controle de transmissão da enfermidade.

O sequenciamento genético para diferenciação das espécies de *Culex* sp. positivas para *Avipoxvírus* nesse estudo será realizado com alvo no gene Citocromo Oxidase I (COI) a fim de viabilizar a publicação desse trabalho e melhor estabelecer as relações hospedeiro-vetor na região estudada.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual 2020**. Acesso em 10/03/21. Disponível em: https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf. 2020.
- ALMEIDA A. P. G. Os mosquitos (Diptera, Culicidae) e sua Importância Médica em Portugal. Desafios para o Século XXI. **Acta Med Port**, 24: 961-974, 2011.
- AFONSO, C. L.; TULMAN, E. R.; LU, Z.; ZSAK, L.; KUTISH, G. F.; ROCK, D. L. The genome of fowl poxvirus. **J Virol**, 74 (8): 3815-3831. 2000.
- AKEY, B. L., NAYAR, J. K.; FORRESTER, D. J. Avian pox in Florida wild turkeys: *Culex nigripalpus* and *Wyeomyia vanduzeei* as experimental vectors. **J. Wildl. Dis.** 17(4):597-599. 1981.
- ALDERS, R. G.; DUMAS, S. E.; RUKAMBILE, E.; MAGOKE, G.; MAULAGA, W.; JONG, J.; COSTA, R. Family poultry: Multiple roles, systems, challenges, and options for sustainable contributions to household nutrition security through a planetary health lens. **Maternal & Child Nutrition** 14(S3):1-14. 2018.
- ALEHEGN, E.; MERSHA, C.; DESALEGNE, M. A Systematic Review of Serological and Clinicopathological Features and Associated Risk Factors of Avian Pox, **British Journal of Poultry Sciences** (3): 78-87, 2014.
- ALLEY, M. R.; HALE, K. A., CASH, W.; HA, H. J.; HOWE, L. Concurrent avian malaria and *Avipoxvirus* infection in translocated South Island saddlebacks (*Philesturnus carunculatus carunculatus*). **N Z Vet J**, 58:218–223, 2010.
- AYRES, C. F. J.; ROMÃO, T. P. A., MELO-SANTOS, M. A. V. Genetic Diversity in Brazilian Populations of *Aedes albopictus*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 97(6): 871-875, 2002.
- BECKER, N.; PETRIC, D.; ZGOMBA, M.; BOASE, C.; MADON, M. B.; DAHL, C.; KAISER, A. Mosquitoes and their control. 2nd edition. **New York: Kluwer Academic Publishers**. 498 p. 2010.
- BERLIN, G. W.; BELKIN, J. N. Mosquito studies (Diptera, Culicidae). **Contributions of the American Entomological Institute**, Volume 17, Number 2, 1980.
- BERCHIERI, A. J.; SILVA, E.N., FABIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. **Doenças das Aves. Vol.1. 2ª ed. FACTA**, Campinas. 1104p. 2009.
- BETAKOVA, T., WOLFFE, E. J, MOSS, B. Regulation of vaccinia virus morphogenesis: phosphorylation of the *A14L* and *A17L* membrane proteins and C-terminal truncation of the *A17L* protein are dependent on the *F10L* kinase. **J Virol**. 73:3534–3543. 1999.
- BINNS, M. M.; BOURSNEILL, M. E. G.; TOMLEY, F. M.; CAMPBELL, J. Analysis of the fowlpoxvirus gene encoding the 4b core polypeptide and demonstration that it possesses efficient promoter sequences. **Virol**. 170: 288–291. 1989.
- BOLLINGER, O. Ueber menschen-und thierpocken, ueber den ursprung der kuhpocken und ueber intrauterine vaccination. **Volkmann's sammlung klinischer vortraege** 116:1021–1060. 1873.
- BOLTE, A. L.; MEURER, J.; KALETA, E. F. Avian host spectrum of avipoxviruses. **Avian Pathology**. c.28, p.415-432, 1999.
- BRODY, A. L. The transmission of fowl pox. **Cornell Univ. Agr. Expt. Sta. Memoir**. 195, 1936.
- BULLER, R. M.; PALUMBO, G. J. Poxvirus pathogenesis. **Microbiol Rev**. Mar;55(1):80-122. 1991.

- CABRINI, I.; ANDRADE, C. F. S., Resposta de Fêmeas de Mosquitos ao Hospedeiro – busca por Alimentação. Página na Internet: **Ecologia Aplicada** - Instituto de Biologia da UNICAMP. 2006.
- CANAL, C. W.; DIEL, D. G.; In: Flores, E. F. (org.) Virologia Veterinária: virologia geral e doenças víricas. 3ed. **Santa Maria, UFSM**, 2017. p. 585-620.2017.
- CAVALCANTI, M. P.; DE LORENA, M. B.; GOMES, M. Y. Avanços biotecnológicos para o diagnóstico das doenças infecciosas e parasitárias. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n. 1, p. 01-14, 2008.
- CHACÓN, R. D.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; DE LA TORRE, D I.; DE SÁ, L. R. M.; FERREIRA, A. J. P. An atypical clinicopathological manifestation of fowlpox virus associated with reticuloendotheliosis virus in commercial layinghen flocks in Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**. v 67. i 6: 2923-2935. 2020.
- CHOW, V. T. K.; CHAN, Y. C.; YONG, R.; LEE, K. M.; LIM, L. K.; CHUNG, Y. K., LAM, S. G.; TAN, B. T.; Monitoring of dengue viruses in field-caught *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes by a type-specific polymerase chain reaction and cycle sequencing. **The American Journal Tropical Medicine and Hygiene** 58: 578-586, 1998.
- COELHO, D. C; FABRINI, E. Subsistence production and self-consumption in the context of agribusiness expansion. **Rev Nera**. Vol. 17, no. 25. 73-87. 2014.
- CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, 228p. 1994.
- COSTA, C. A.; SANTOS, I. G. C.; BARBOSA, M. G. Detecção e tipagem de vírus dengue em *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) na Cidade de Manaus, Estado do Amazonas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Vol.42, no.6 Uberaba. 2009.
- CLEMENTS, A. The Biology of Mosquitoes: Development, Nutrition and Reproduction. **Chapman and Hall**, London. 1992.
- DAMASSA, A. J. The role of *Culex tarsalis* in the transmission of Fowlpox Virus. **Avian Dis**.10:57–66, 1966.
- DAVIDSON, W. R.; KELLOGG, F. E.; DOSTER, G. L. An epornitic of avian pox in wild Bobwhite Quail. **Journal of Wildlife Diseases**, 16:293–298.2011; 24: 961-974. 1980.
- DEMARI-SILVA, B.; VESGUEIRO, F. T.; SALLUM, M. A.; MARRELLI, M. T. Taxonomic and phylogenetic relationships between species of the genus *Culex* (Diptera: Culicidae) from Brazil inferred from Barcode identification of *Culex* by the cytochrome c oxidase I mitochondrial gene. **J Med Entomol** 48: 272-279. 2011.
- EO, K. Y.; KIM, Y. H.; CHO, K. H.; JANG, J. S.; KIM, T. H.; KWAK, D.; KWON, O.D.; Infection of avian pox virus in oriental turtledoves. **Pakistan Veterinary Journal**. 31(4):354-356. 2011.
- ESPINDOLA, C. J. Trajetórias do progresso técnico na cadeia produtiva de carne de frango do Brasil. **Revista Geosul**, Florianópolis, v. 27, n. 53, p. 89-113. 2012.
- FERREIRA, B.; ECCO, R.; COUTO, R. M., COELHO, H. E.; ROSSI, D. A.; BELETI, M. E.; SILVA, P. L. Outbreak of cutaneous form of avian poxvirus disease in previously pox-vaccinated commercial turkeys. **Pesq. Vet. Bras**. 38(3):417-424, 2018.
- FORATTINI, O. P. Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia, Vol. 2, **EDUSP, São Paulo**, 864 pp. 2002.
- FORRESTER, D. J. The ecology and epizootiology of avian pox and malaria in Wild Turkeys. **Bulletin of the Society for Vector Ecology** 16:127–148. 1991.
- GARCIA JR, A. R. Terra de Trabalho: trabalho familiar de pequenos produtores. **São Paulo: Paz e Terra**, 1983.

GIRAUDEAU, M.; MOUSEL, M.; EARL, S.; MCGRAW, K. Parasites in the city: Degree of Urbanization Predicts Poxvirus and Coccidian Infections in House Finches (*Haemorrhous mexicanus*). **Plos One**. 9(2), e86747. 2014.

GOODMAN, H. Primary blood hosts of mosquitoes are influenced by social and ecological conditions in a complex urban landscape. **Rev parasites and Vectors**. 2018.

GUBSER, C.; HUÉ, S.; KELLAM, P.; SMITH, G. L. Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **J. Gen. Virol**. 85(Pt 1):105-117. 2004.

GYURANECZ, M.; FOSTER, J. T.; DÁN, Á.; IP, H. S.; EGSTAD, K. F.; PARKER, P. G.; HIGASHIGUCHI, J. M.; SKINNER, M. A.; HÖFLE, U.; KREIZINGER, Z.; DORRESTEIN, G. M.; SOLT, S.; SÓS, E.; KIM, Y. J.; UHART, M.; PEREDA, A.; GONZÁLEZ-HEIN, G.; HIDALGO, H.; BLANCO, J.; ERDÉLYI, K. Worldwide Phylogenetic Relationship of Avian Poxviruses. **Journal of Virology**, p. 4938-4951. 2013.

HARBACH, R. The Culicidae (Diptera): A Review of Taxonomy, Classification And Phylogeny. **Zootaxa**. 591-638, 2007.

HESS, C.; MAEGDEFRAU-POLLAN, B.; BILIC, I.; LIEBHART, D.; RICHTER, S.; MITSCH, P. Outbreak of cutaneous form of poxvirus on a commercial turkey farm caused by the species fowlpox. **Avian Dis.** ;55:714–718. 2011.

HEUSINGER, C. F. Recherches de Pathologie Comparee Cassel, **Henri Hotop**, 1, 649. 1844.

ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses, 2016. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/>. Acesso: 20/02/2021.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2006 [Online]. **Censo Agropecuário 2017**, Resultados preliminares. Homepage:<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm>

JARMIN, S.; MANVELL, R.; GOUGH, R. E.; LAIDLAW, S. M.; SKINER, M. A. *Avipoxvirus* phylogenetics: identification of a PCR length polymorphism that discriminates between the two major clades. **Journal of General Virology**, 87(Pt 8):2191-201, 2006.

KATO, K.; ROZEWICKI, J.; YAMADA, K. D. MAFFT. Online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Brief Bioinform**. bbx108 1–7. 2017.

KLIGER, I. J.; MUCKENFUSS, R. S.; RIVERS, T. M. Transmission of fowl-pox by mosquitoes. **Proc. Soc. Exptl. Biol. Med**. 26, 128-129, 1928.

KRONE, O. S.; ESSBAUER, G.; WIBBELT, G; RUDOLPH, I. M.; GOUGH, R. E. *Avipoxvirus* infection in peregrine falcons (*Falco peregrinus*) from a reintroduction programme in Germany. **Veterinary Record** 154: 110-113. 2004.

KUMAR, N. P.; RAJAVEL, A. R.; NATARAJAN, R.; JAMBULINGAM, P. DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). **J Med Entomol**;44:1–7. 2007.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol**. 33:1870–1874. 2016.

LAPUENTE J.; MERINO, S.; LOBATO, E.; RIVERO-DE-AGULIAR, J.; DEL CERRO, S.; RUIZ-DE-CASTAÑEDA, R.; MORENO, J. Does weather affect biting fly abundance in avian nests? **J Avian Biol** 40: 653–657. 2009.

LAPUENTE J.; MERINO, S.; LOBATO, E.; RIVERO-DE-AGULIAR, J.; DEL CERRO, S.; RUIZ-DE-CASTAÑEDA, R.; MORENO, J. Nest-climatic factors affect the abundance of biting flies and their effects on nestling condition. **Acta Oecol** 36: 543–547. 2010.

LEBDAH, M. A.; OLA, A. H.; AMIRA, M. I. Avipoxvirus in Egypt and African continent: A review. **Zagazig Veterinary Journal** 47(4):364-377, 2019.

- LEE, H. & LEE K. W. Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of fowl poxvirus infection. **J Virol Methods**. 63:113–119, 1997.
- LEE, H. R.; KOO, B. S.; KIM, J. T.; KIM, H. C.; KIM, M. S.; KLEIN, T. A.; SHIN, M. S.; LEE, S.; JEON, E. O.; MIN, K. C.; LEE, S. B.; BAE, Y.; MO, I. P. Molecular epidemiology of Avian Poxvirus in the oriental turtle dove (*Streptopelia orientalis*) and the biting midge (*Culicoides arakawae*) in the Republic of Korea. **Journal of Wildlife Diseases**, 53(4):749-760. 2017.
- LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R. Alguns aspectos da ecologia dos mosquitos (Diptera: Culicidae) de uma área de planície (Granjas Calábria), em Jacarepaguá, Rio de Janeiro. I-Frequência comparativa das espécies e métodos de coleta. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 79:479-90. 1984.
- LÜSCHOW, D.; HOFFMANN, T.; HAFEZ, H. M.; Differentiation of Avian Poxvirus Strains on the Basis of Nucleotide Sequences of 4b Gene Fragment. **Avian Diseases**, Vol. 48, No. 3, p. 453-462, 2004.
- 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
- MAPACO, L. P.; LACERDA, Z.; MONJANE, I. V. A; GELAYE, E.; SUSSURO, A. H.; VILJOEN, G. J. Identification of clade E avipoxvirus, Mozambique. **Emerg Infect Dis** 23:1602–1604, 2016.
- MAPACO, L. P.; LACERDA, Z.; MONJANE, I. V. A; GELAYE, E.; SUSSURO, A. H.; VILJOEN, G. J.; CATTOLI, G.; DUNDON, W. G.; ACHÁ, S. J. Molecular characterization of avipoxviruses circulating in Mozambique, 2016-2018. **Archives of Virology**. 2018.
- MARTINS, S. S. Avicultura de corte: situações e perspectivas em maio de 2005. **Informações Econômicas**, v.35, n.7, São Paulo: IEA, pp. 57-59. 2005.
- MEDEIROS-SOUSA, A. R.; CERETTI-JUNIOR, W.; URBINATTI, P. R.; NATAL, D.; CARVALHO, G. C.; PAULA, M. B.; FERNANDES, A.; HOMEM DE MELO, M. H. S.; OLIVEIRA, R. C.; ORICO, L. D.; GONÇALVES, E. F. B; MARRELLI, M. T. Mosquito (Diptera: Culicidae) survey in parks of São Paulo City I. **Biota Neotrop**. 13(1). 2013.
- MOCKETT, B.; BINNS, M. M.; BOUSRSNELL, M. E. G.; SKINNER, M. A. Comparison of the locations of homologous fowlpox and vaccinia virus genes reveals major genome reorganization. **J. Gen. Virol**. 73:2661–2668. 1992.
- MOHAN, M.; FERNANDEZ, T. F. A case report of Pigeon Pox - Histopathologic Diagnosis. **Veterinary World**;1(4):117-118, 2008.
- MOÇO, H. F.; DIAS, L. C.; ANDOLFATO, L. H. M.; ALVES, M. L.; BRONZATTO, A.; RAYA, D. A. Boubá Aviária. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**. 6(11):1-5, 2008.
- MULLER, H. K., WITTEK, R.; SCHAFFNER, W.; SCHUMPERLI, D.; MENNA, A.; WYLER, R.. Comparison of five poxvirus genomes by analysis with restriction endonucleases *HindIII*, *BamI* and *EcoRI*. **J. Gen. Virol**. 38:135–147. 1978.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J; HORZINEK, M. C.; STUDDERT, M. J. **Veterinary Virology**, 3rd Ed. Academic Press, New York, NY, U.S.A., 629 pp. 1999.
- PEREIRA, M. G. Epidemiologia - Teoria e Prática. **Guanabara Koogan**, p. 337-357, 2005.
- PROCTOR, H. & OWEN, I. Mites and birds: Diversity, parasitism and coevolution. **Trends in Ecology and Evolution**, 15:358-364. 2000.
- REED, W. M.; SCHRADER, D. L. Pathogenicity and immunogenicity of Mynah pox virus in 31 chickens and Bobwhite quail. **Poultry Science**, v. 68, p. 631-638, 1989.

REJON, J. E.; BLITVICH, B. J.; FARFAN-ALE, J.A.; LOROÑO-PINO, M. A.; CHI-CHIM, W. A.; FLORES, L. F.; ROSADO-PAREDES, E.; BAAKBAK, C.; PEREZ-MUTUL, J.; SUAREZ-SOLIS, V.; FERNANDEZ-SALAS, I.; BEATY, B. J. Host-feeding preference of the mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. 12pp. **Journal of Insect Science**. 2010.

RUPLEY, A. E. Manual de Clínica Aviária. São Paulo: **Roca**, p.301. 1999.

SAIF, E. & EL-BALLAL, S. S. Epidemiological and Ultrastructural Studies on Pigeon Pox in Upper Egypt, Assiut. **Vet. Med.** J.37.73, 68.85; 32. 1997.

SENNE, N. A.; VILELA, T. S.; SANAVRIA, A. S. A.; SANTOS, H. A.; ANGELO, C. N. A. Ecology and spatial distribution of sand fly species in low endemic areas for American Tegumentary Leishmaniasis in the municipality of Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. **Med Vet Entomology**, p 1-8. 2021.

SKINNER, M. A., In: Jordan, F (ed.), Poxviridae in Poultry Disease, Philadelphia, **Elsevier Ltd**, USA. ISBN: 978-0-7020-2862-5, 2008.

SLOCOMBE, R. F.; MCCOWAN, C.; WANG, J.; HOLZ, P. Avian pox in crimson rosellas (*Platycercus elegans*) in southern Australia. **Avian Pathology**, Vol. 42, No. 2, 147150, 2013.

STAMATAKIS, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. **Bio informatics** 30:1312–1213. 2014.

STROUD, R. Diseases of Canaries. **T.F.H. Publications**, Inc., Neptune City, New Jersey, U.S.A., 239 pp. 1933.

TALAVERA, G. & CASTRESANA, J. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. **Syst Biol** 56:564–577. 2007.

TRIPATH, D. N. & REED, W. N. Chapter: Pox, p.643-659. In: Thomas N.J., Hunter D.B. & Atkinson C.T. (Eds), **Diseases of Poultry**. 10th ed. Iowa State University Press, Ames. 1997.

TRIPATH, D. N. & REED, W. N. Chapter: Pox, p. 253-269. In: Saif Y. M., Barnes H. J., Glisson J. R., Fadly A. M., McDougald L. R. & Swayne D. E. (Eds), **Diseases of Poultry**. 11th ed. Iowa State University Press, Ames. 2003.

TRIPATH, D. N. & REED, W. N. Chapter: Pox, p. 291-308. In: Saif Y. M., Fadly A. M., Glisson J. R., McDougald L. R., Nolan L. K. & Swayne D. E. (Eds), **Diseases of Poultry**. 12th ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa. 2008.

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

VAN RIPER, C. III; VAN RIPER, S. G.; HANSEN, W. The epizootiology and effect of avian pox on Hawaiian forest birds. **Auk** 119:929–942. 2002.

VAN RIPER & FORRESTER, Chapter: 6, Infectious Diseases of Wild Birds (pp.131-176) Publisher: **Blackwell Publishing Editors**: N. J. Thomas, D. B. Hunter, C. T. Atkinson, 2007.

VILELA, T. M. Tese. Padronização de métodos moleculares para o estudo da interação do gênero *Culex* e *Plasmodium* spp. e aspectos ecológicos de culicídeos capturados no Município de Seropédica, Rio de Janeiro. 83p.:il. 2019.

WALTON, C. R.; SHARPE, G.; PRITCHARD, S. J., THEWELL, N. J; BUTLIN, R. K. Molecular identification of mosquito species. **Biological Journal of the Linnean Society**, 68: 241-256. 1999.

WIKELSKI, M.; FOUFOPOLOS, J.; VARGAS, H.; SNELL, H. Galapagos birds and disease: Invasive pathogens as threats for island species. **Ecology and Society**, 9(1):5. <http://www.ecologyandsociety.org/vol9/iss1/art5> 2004.

YANG, S.; ROTHMAN, R. E. PCR-based diagnostics for infectious diseases: uses, limitations, and future applications in acute-care settings. **The Lancet infectious diseases**, v. 4, n. 6, p. 337-348, 2004.

YEO, G.; WANG, Y.CHONG, S. M.; HUMAIDI, M.; LIM, X. F.; MAILEPESSOV, D.; CHAN, S.; HOW, C. B.; LIN, Y. N.; HUANGFU, T.; FERNANDEZ, C. D.; HAPUARACHCHI, C.; YAP, G. Characterization of Fowlpox virus in chickens and bird-biting mosquitoes: a molecular approach to investigating *Avipoxvirus* transmission. **J Gen Virol.**100(5):838-850, 2019.

YOSHIKAWA, M. G. T. & ALAM, J. Histopathological studies of fowl pox in Bantams. 21. **International Journal of Poultry Science**, v.1, p. 197-199, 2002.

ZANTINGE, J. L.; KRELL. P. J.; DERBYSHIRE, J. B.; NAGY, E. Partial transcriptional mapping of the fowlpox virus genome and analysis of the *EcoRI* L fragment. **J. Gen. Virol.** 77:603–614. 1996.

9. ANEXOS

ANEXO I - Relação de amostras positivas para sangue de galináceos no *Triplex* qPCR e correlação com positivas para *Avipoxvírus*

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A01	8	CL	P	N
A02	8	CL	P	N
A03	9	CL	P	N
A04	8	CL	N	N
A05	8	CL	P	N
A06	8	CL	P	N
A07	7	CL	P	N
A08	7	CL	P	N
A09	11	SM	P	N
A10	7	CL	P	N
A11	8	CL	P	N
A12	7	CL	P	N
A13	7	CL	P	N
A14	7	CL	P	N
A15	2	CL	P	N
A16	7	CL	P	N
A17	7	CL	P	N
A18	8	CL	P	N
A19	13	SM	P	N
A20	6	CL	P	N
A21	7	CL	P	N
A22	7	CL	P	N
A23	7	CL	P	N
A24	7	CL	P	N
A25	4	CL	P	N
A26	7	CL	P	N
A27	7	CL	P	N
A28	7	CL	P	N
A29	12	VL	P	N
A30	7	CL	P	N
A31	4	CL	P	N
A32	7	CL	P	N
A33	8	CL	P	N
A34	13	SM	P	N
A35	7	CL	P	N
A36	4	CL	P	N
A37	11	VL	P	N
A38	7	CL	P	N
A39	7	CL	P	N

ANEXO I – Continuação.

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A40	7	CL	P	N
A41	7	CL	P	N
A42	7	CL	P	N
A43	7	CL	P	N
A44	7	CL	P	N
A45	7	CL	P	P
A46	7	CL	P	N
A47	4	CL	P	N
A48	7	CL	P	N
A49	7	CL	P	N
A50	6	CL	P	N
A51	12	VL	P	N
A52	7	CL	P	N
A53	13	SM	P	N
A54	13	SM	P	N
A55	12	VL	N	N
A56	12	VL	P	N
A57	4	CL	P	P
A58	9	CL	P	N
A59	11	VL	P	N
A60	13	SM	P	N
A61	12	VL	P	N
A62	15	SM	P	N
A63	9	CL	P	N
A64	13	SM	P	N
A65	15	SM	P	N
A66	2	CL	P	N
A67	12	VL	P	N
A68	15	SM	N	N
A69	13	SM	P	P
A70	12	VL	P	N
A71	15	SM	P	N
A72	15	SM	P	N
A73	10	CL	P	N
A74	15	SM	P	N
A75	13	SM	P	N
A76	15	SM	N	P
A77	13	SM	P	N
A78	13	SM	P	P
A79	10	CL	P	N
A80	13	SM	P	N

ANEXO I – Continuação.

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A81	15	SM	P	N
A82	13	SM	P	N
A83	13	SM	P	P
A84	11	VL	P	N
A85	4	CL	N	P
A86	8	CL	P	N
A87	13	SM	P	N
A88	13	SM	P	P
A89	11	VL	P	N
A90	15	SM	P	N
A91	8	CL	N	N
A92	10	CL	P	N
A93	11	VL	N	N
A94	11	VL	P	P
A95	11	VL	P	N
A96	8	CL	P	N
A97	7	CL	P	N
A98	11	VL	P	N
A99	13	SM	N	N
A100	14	SM	P	P
A101	8	CL	P	N
A102	14	SM	P	N
A103	13	SM	P	N
A104	13	SM	P	N
A105	13	SM	P	N
A106	11	VL	P	N
A107	14	SM	P	N
A108	13	SM	P	N
A109	14	SM	P	N
A110	11	VL	P	N
A111	8	CL	P	N
A112	11	VL	P	N
A113	14	SM	P	N
A114	14	SM	P	N
A115	8	CL	P	N
A116	14	SM	P	N
A117	13	SM	P	N
A118	12	VL	P	N
A119	8	CL	P	N
A120	13	SM	P	N

ANEXO I – Continuação.

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A121	11	VL	P	N
A122	5	CL	N	N
A123	6	CL	P	N
A124	13	SM	P	N
A125	7	CL	P	N
A126	4	CL	P	N
A127	5	CL	P	N
A128	7	CL	P	N
A129	4	CL	P	N
A130	6	CL	P	N
A131	13	SM	P	N
A132	12	VL	P	N
A133	13	SM	N	N
A134	11	VL	P	N
A135	5	CL	P	N
A136	13	SM	P	N
A137	12	VL	P	N
A138	10	CL	P	N
A139	12	VL	P	P
A140	8	CL	N	N
A141	8	CL	P	N
A142	13	SM	P	P
A143	6	CL	P	N
A144	8	CL	P	P
A145	10	CL	P	N
A146	12	VL	P	N
A147	4	CL	P	N
A148	5	CL	P	N
A149	7	CL	P	N
A150	13	SM	P	N
A151	4	CL	P	N
A152	11	VL	P	N
A153	5	CL	P	N
A154	11	VL	P	N
A155	12	VL	P	N
A156	7	CL	P	N
A157	7	CL	P	N
A158	11	VL	P	N
A159	11	VL	P	N
A160	11	VL	P	N

ANEXO I – Continuação.

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A161	11	VL	N	N
A162	7	CL	P	P
A163	7	CL	P	N
A164	6	CL	P	P
A165	5	CL	P	N
A166	14	SM	P	N
A167	14	SM	P	N
A168	14	SM	P	N
A169	7	CL	P	P
A170	2	CL	P	N
A171	2	CL	P	N
A172	2	CL	N	P
A173	12	VL	P	N
A174	7	CL	P	P
A175	11	VL	N	N
A176	11	VL	P	P
A177	11	VL	P	N
A178	2	CL	P	N
A179	14	SM	P	N
A180	8	CL	N	N
A181	7	CL	P	N
A182	7	CL	P	N
A183	8	CL	P	P
A184	7	CL	P	N
A185	8	CL	N	P
A186	10	CL	P	N
A187	10	CL	P	P
A188	10	CL	N	N
A189	10	CL	P	N
A190	6	CL	P	N
A191	6	CL	P	P
A192	8	CL	P	P
A193	10	CL	P	N
A194	11	VL	P	N
A195	14	SM	P	N
A196	3	CL	P	N
A197	12	VL	P	N
A198	4	CL	P	N
A199	11	VL	P	N

ANEXO I – Continuação.

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A200	10	CL	P	P
A201	5	CL	P	N
A202	14	SM	P	N
A203	6	CL	P	N
A204	7	CL	P	P
A205	11	VL	P	N
A206	7	CL	P	N
A207	8	CL	P	N
A208	11	VL	P	P
A209	14	SM	P	N
A210	13	SM	N	N
A211	13	SM	P	N
A212	13	VL	P	N
A213	13	SM	P	N
A214	7	CL	P	N
A215	2	CL	N	N
A216	10	CL	P	N
A217	14	SM	P	P
A218	13	SM	P	N
A219	13	SM	P	N
A220	15	SM	P	P
A221	6	CL	P	P
A222	13	SM	P	N
A223	15	SM	P	N
A224	13	SM	P	N
A225	11	VL	P	N
A226	7	CL	P	P
A227	13	SM	P	P
A228	6	CL	P	P
A229	15	SM	P	N
A230	11	VL	P	N
A231	3	CL	P	N
A232	11	VL	P	N
A233	11	VL	P	N
A234	15	SM	P	N
A235	15	SM	P	N
A236	15	SM	P	N
A237	15	SM	P	N
A238	15	SM	P	N
A239	15	SM	N	N

ANEXO I – Continuação.

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A240	13	SM	P	P
A241	15	SM	P	N
A242	7	CL	P	N
A243	13	SM	P	N
A244	15	SM	P	P
A245	15	SM	P	N
A246	15	SM	P	N
A247	15	SM	P	N
A248	15	SM	P	N
A249	13	SM	P	P
A250	15	SM	P	N
A251	13	SM	P	N
A252	9	CL	P	N
A253	6	CL	P	N
A254	10	CL	P	N
A255	10	CL	P	N
A256	9	CL	P	N
A257	5	CL	P	N
A258	10	CL	P	N
A259	9	CL	N	N
A260	10	CL	P	N
A261	7	CL	P	P
A262	14	SM	P	P
A263	15	SM	P	N
A264	14	SM	P	N
A265	2	CL	P	N
A266	10	CL	P	N
A267	14	SM	P	N
A268	14	SM	P	N
A269	14	SM	P	N
A270	10	CL	P	N
A271	11	VL	P	N
A272	2	CL	N	N
A273	6	CL	P	N
A274	6	CL	P	N
A275	6	CL	P	N
A276	2	CL	N	N
A278	2	CL	N	N
A279	15	SM	P	N
A280	11	VL	P	N

ANEXO I – Continuação.

Amostra	Nº armadilha	Bairro	Fonte Alimentar <i>Gallus gallus</i>	PCR+ para Detecção de <i>Avipoxvírus</i>
A281	11	VL	P	N
A282	15	SM	P	N
A283	13	SM	P	P
A284	15	SM	P	N
A285	6	CL	P	N
A286	8	CL	P	P
A287	6	CL	P	N
A288	7	CL	P	N
A289	7	CL	P	N
A290	4	CL	P	N
A291	8	CL	P	N
A292	10	CL	N	N
A293	15	SM	N	N
A294	6	CL	P	N
A295	15	SM	P	N
A296	13	SM	P	P
A297	14	SM	P	N
A298	10	CL	P	N
A299	11	VL	P	N
A300	7	CL	P	N

ANEXO II – Lista de informações das amostras e número de acesso ao GenBank das sequências utilizadas para comparação nesse estudo

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
B3	DQ131899	EUA	2005	<i>Cardinalis cardinalis</i>
B3	DQ131896	EUA	2005	<i>Haemorhous mexicanus</i>
B3	DQ131897	EUA	2005	<i>Zenaida macroura</i>
B3	DQ131889	EUA	2005	<i>Corvus brachyrynchos</i>
B3	KC018068	EUA	2013	<i>Turdus migratorius</i>
B3	DQ131901	EUA	2005	<i>Buteo jamaicensis</i>
B3	DQ131900	EUA	2005	<i>Polioptila caerulea</i>
B3	DQ131895	EUA	2005	<i>Mimus polyglottos</i>
B3	DQ131893	EUA	2005	<i>Corvus brachyrynchos</i>
B3	DQ131902	EUA	2005	<i>Turdus migratorius</i>
B3	DQ131894	EUA	2005	<i>Turdus migratorius</i>
B3	DQ131898	EUA	2005	<i>Ardea herodias</i>
B1	KC588955	Brasil	2013	<i>Spheniscus magellanicus</i>
B1	KC588959	Brasil	2013	<i>Spheniscus magellanicus</i>
B1	KC588957	Brasil	2013	<i>Spheniscus magellanicus</i>
B1	KC588961	Brasil	2013	<i>Spheniscus magellanicus</i>
B1	KC588956	Brasil	2013	<i>Spheniscus magellanicus</i>
B1	KC588960	Brasil	2013	<i>Spheniscus magellanicus</i>
B1	KC588958	Brasil	2013	<i>Spheniscus magellanicus</i>
B1	MH175228	EUA	2018	<i>Melanospiza bicolor</i>
B1	KC018035	EUA	1993	<i>Colinus virginianus ridgwayi</i>
B1	MH175225	EUA	2008	<i>Colinus virginianus ridgwayi</i>
B1	KC018060	Chile	2008	<i>Serinus canaria</i>
B1	MH175220	EUA	2009	<i>Corvus brachyrynchos</i>
B1	LC055559	Japão	2007	<i>Corvus macrorhynchos</i>
B1	LC055561	Japão	2007	<i>Corvus corone</i>
B1	LC055562	Japão	2007	<i>Corvus corone</i>
B1	LC055558	Japão	2007	<i>Corvus corone</i>
B1	LC055560	Japão	2007	<i>Corvus macrorhynchos</i>
B1	MH175236	Canadá	2011	<i>Corvus brachyrynchos</i>
B1	GQ180211	Itália	2016	<i>Corvus cornix</i>
B1	EF568382	EUA	2008	<i>Hemignathus virens</i>
B1	EU798995	R. Tcheca	2008	<i>Parus major</i>
B1	KC018044	EUA	1999	<i>Corvus brachyrynchos</i>
B1	KC018048	EUA	1992	<i>Grus canadensis</i>
B1	KC018049	EUA	1994	<i>Catarus ustulatus</i>
B1	KC018057	EUA	1996	<i>Himatione saguinea</i>
B1	KC018039	EUA	2004	<i>Corvus corax</i>
B1	KC018041	EUA	1980	<i>Uria aalge</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
B1	KC018053	EUA	1986	<i>Junco hyemalis hyemalis</i>
B1	EF568380	EUA	2008	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	KC018054	EUA	1989	<i>Branta canadensis</i>
B1	FJ863096	Rep. Tcheca	2008	<i>Parus major</i>
B1	MH175221	EUA	2008	<i>Meleagris gallopavo</i>
B1	KC018045	Espanha	2000	<i>Circus cyaneus</i>
B1	KC018051	EUA	2008	<i>Spheniscus humboldti</i>
B1	KC018055	EUA	1996	<i>Chasiempis sandwichensis</i>
B1	KC018058	Espanha	2000	<i>Aquila chrysaetos</i>
B1	EF568392	EUA	2008	<i>Hemignathus virens</i>
B1	KC018040	EUA	2005	<i>Corvus brachyrhynchos</i>
B1	KC018050	EUA	1985	<i>Leucosticte tephrocotis</i>
B1	KC018056	EUA	1996	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	EF568394	EUA	2007	<i>Hemignathus virens</i>
B1	GQ180213	Itália	2016	<i>Prunella modularis</i>
B1	KF956001	Alemanha	2013	<i>Parus major</i>
B1	KC018047	Hungria	2007	<i>Parus major</i>
B1	EF568385	EUA	2007	<i>Corvus hawaiiensis</i>
B1	EF568395	EUA	2007	<i>Hemignathus virens</i>
B1	KC018046	Bélgica	2008	<i>Pyrrhula pyrrhula</i>
B1	EF568383	EUA	2007	<i>Diomedea immutabilis</i>
B1	EF568396	EUA	2007	<i>Hemignathus virens</i>
B1	EF568401	EUA	2008	<i>Hemignathus virens</i>
B1	AM050375	Reino Unido	2006	<i>Gallus gallus</i>
B1	AM050390	Reino Unido	2006	<i>Gallus gallus</i>
B1	AM050389	Reino Unido	2006	<i>Gallus gallus</i>
B1	GQ180209	Itália	2016	<i>Columba livia</i>
B1	GQ180205	Itália	2009	<i>Turdus philomelos</i>
B1	GQ487567	Canadá	2016	<i>Cyanocitta cristata</i>
B1	MF102266	Irã	2017	<i>Serinus canaria</i>
B1	GQ180203	Itália	2009	<i>Serinus canaria</i>
B1	MF102267	Irã	2017	<i>Serinus canaria</i>
B1	GQ180202	Itália	2009	<i>Serinus canaria</i>
B1	AY530309	Alemanha	2004	<i>Serinus canaria</i>
B1	KF673397	Irã	2013	<i>Serinus canaria</i>
B1	AM050384	Reino Unido	2006	<i>Serinus canaria</i>
B1	KC193679	Irã	2013	<i>Serinus canaria</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
B1	MF102272	Irã	2016	<i>Serinus canaria</i>
B1	GU108510	Áustria	2009	<i>Serinus canaria</i>
B1	AY530308	Alemanha	2004	<i>Passer domesticus</i>
B1	HQ875130	Portugal	2016	<i>Serinus canaria</i>
B1	KC018037	EUA	2013	<i>Pica hudsonia</i>
B1	KC018036	EUA	2008	<i>Corvus brachyrhynchos</i>
B1	EF568378	EUA	2008	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	KC018059	EUA	1996	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	KC018042	Equador	2008	<i>Geospiza fortis</i>
B1	KC018043	Equador	2008	<i>Camarhynchus pallidus</i>
B1	FJ863095	R. Tcheca	2007	<i>Parus major</i>
B1	KC018052	EUA	1987	<i>Hemignathus virens</i>
B1	MH175226	EUA	2008	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>
B1	EF568393	EUA	2008	<i>Hemignathus virens</i>
B1	EF568381	EUA	2008	<i>Loxioides bailleui</i>
B1	KC018022	EUA	1986	<i>Junco hyemalis hyemalis</i>
B1	KC018033	Equador	2008	<i>Geospiza fortis</i>
B1	KC018019	EUA	1986	<i>Serinus canaria</i>
B1	EF568379	EUA	2008	<i>Hemignathus virens</i>
B1	EF568391	EUA	2008	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	KC018034	Equador	2008	<i>Mimus parvulus</i>
B1	KC018014	EUA	1986	<i>Serinus canaria</i>
B1	KC018028	EUA	2001	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018026	EUA	1998	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018030	EUA	1988	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018027	EUA	1998	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018016	EUA	1996	<i>Serinus canaria</i>
B1	KC018023	EUA	1991	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018020	EUA	1996	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	EF568387	EUA	2007	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	EF568389	EUA	2007	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	EF568384	EUA	2008	<i>Vestiaria coccinea</i>
B1	EF568386	EUA	2008	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	EF568399	EUA	2008	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018029	EUA	2001	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018024	EUA	1995	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	KC018032	EUA	1987	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	EF568388	EUA	2008	<i>Himatione sanguinea</i>
B1	KC018017	EUA	1996	<i>Serinus canaria</i>
B1	KC018018	EUA	1996	<i>Himatione sanguinea</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
B1	KC018031	EUA	2013	<i>Corvus brachyrhynchos</i>
B1	KC018015	EUA	1996	<i>Serinus canaria</i>
B1	KC018021	EUA	1996	<i>Serinus canaria</i>
B1	EF568400	EUA	2007	<i>Carpodacus mexicanus</i>
B1	EF568390	EUA	2008	<i>Himatione sanguinea</i>
B2	AM050386	Reino Unido	2005	<i>Gallus gallus</i>
B2	LC545572	Japão	2020	<i>Phalacrocorax capillatus</i>
B2	KC018067	Hungria	2013	<i>Gracula religiosa</i>
B2	KC018064	EUA	1985	<i>Sturnus vulgaris</i>
B2	KC018063	EUA	1984	<i>Sturnus vulgaris</i>
B2	KC018065	EUA	1985	<i>Sturnus vulgaris</i>
B2	AM050391	Reino Unido	2006	<i>Gallus gallus</i>
B2	KC018066	Hungria	2005	<i>Otis tarda</i>
B2	HQ875129	Portugal	2010	<i>Phoenicopterus roseus</i>
B2	LC499632	Japão	2003	<i>Phoenicopterus roseus</i>
A5	KJ192191	China	2014	<i>Anas platyrhynchos</i>
A5	KJ192189	China	2013	<i>Anas platyrhynchos</i>
A5	KJ192190	China	2013	<i>Anas platyrhynchos</i>
A5	KC017994	EUA	1994	<i>Anas platyrhynchos</i>
A5	KC017992	EUA	1991	<i>Anas discors</i>
A5	KC017993	EUA	1991	<i>Aythya americana</i>
A5	MH175227	EUA	2001	<i>Aix sponsa</i>
A5	KC017996	EUA	1991	<i>Aix sponsa</i>
A5	KC017995	EUA	1989	<i>Cygnus buccinator</i>
A5	KC017991	EUA	2005	<i>Anas fulvigula</i>
A	MT332851	EUA	2018	<i>Calypte anna</i>
A	JX418296	EUA	2009	<i>Calypte anna</i>
A7/A6	KC018010	Espanha	2000	<i>Milvus milvus</i>
A7	HQ441566	Taiwan	2008	<i>Spilornis cheela</i>
A7	AB576861	Japão	2004	<i>Haliaeetus albicilla</i>
A7	KR73309	Não inf.	Não inf.	Não informado
A7	KC018008	Hungria	2003	<i>Accipiter gentilis</i>
A7	KC018003	EUA	1993	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>
A7	KC018007	EUA	1989	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>
A7	KC018005	EUA	1993	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>
A7	KC018006	EUA	1985	<i>Buteo jamaicensis</i>
A7	MH175238	Canadá	2013	Não informado
A7	KC018004	EUA	1992	<i>Haliaeetus leucocephalus</i>
A7	MG934698	Japão	2018	<i>Haliaeetus pelagicus</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
A7	KC018009	Hungria	2000	<i>Buteo buteo</i>
A2	KX774284	Coreia	2017	<i>Streptopelia orientalis</i>
A2	EU798994	R. Tcheca	2008	<i>Columba palumbus</i>
A2	KC017973	Coreia do Sul	2012	<i>Streptopelia orientalis</i>
A2	KC017972	Coreia do Sul	2012	<i>Streptopelia orientalis</i>
A2	KX774286	Coreia do Sul	2013	<i>Streptopelia orientalis</i>
A2	KC017974	Espanha	2003	<i>Otis tarda</i>
A2	KX774283	Coreia do Sul	2012	<i>Streptopelia orientalis</i>
A2	KX774285	Coreia do Sul	2011	<i>Streptopelia orientalis</i>
A2	KX774282	Coreia do Sul	2012	<i>Streptopelia orientalis</i>
A2	KC017968	Hungria	2003	<i>Columba livia</i>
A2	GQ180210	Itália	2010	<i>Falco rusticolus</i>
A2	JQ665840	Egito	2011	<i>Columba livia</i>
A2	GQ180208	Itália	2010	<i>Serinus canaria</i>
A2	KC017978	Espanha	2003	<i>Milvus milvus</i>
A2	NC043178	Índia	2006	<i>Coturnix ypsilophora</i>
A2	AY530305	Alemanha	2004	<i>Struthio camelus</i>
A2	EF016108	Itália	2007	<i>Buteo buteo</i>
A2	MF102271	Irã	2016	<i>Columba livia</i>
A2	MF102268	Irã	2016	<i>Serinus canaria</i>
A2	KC017966	EUA	1995	<i>Columba livia</i>
A2	MH175237	Canadá	2012	<i>Columba livia</i>
A2	KC017980	Espanha	2002	<i>Alectoris rufa</i>
A2	KC017965	EUA	1994	<i>Columba livia</i>
A2	KC017975	Hungria	2003	<i>Pavo cristatus</i>
A2	AY530303	Alemanha	2004	<i>Columba livia</i>
A2	MF102270	Irã	2016	<i>Columba livia</i>
A2	KC017979	Espanha	2003	<i>Hieraaetus pennatus</i>
A2	AM050387	Reino Unido	2006	<i>Gallus gallus</i>
A2	KC017969	Hungria	2003	<i>Columba livia</i>
A2	KC017970	Hungria	2003	<i>Otis tarda</i>
A2	MW602950	Egito	2018	<i>Columba livia</i>
A2	AM050388	Reino Unido	2005	<i>Meleagris gallopavo</i>
A2	AM050385	Reino Unido	2006	<i>Columba livia</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
A2	KC017976	Espanha	2000	<i>Hieraaetus pennatus</i>
A2	GQ180204	Itália	2009	<i>Perdix perdix</i>
A2	DQ873810	Índia	2006	<i>Gallus gallus</i>
A2	KC017967	Hungria	2000	<i>Aquila heliaca</i>
A2	DQ873809	Índia	2006	<i>Perdix perdix</i>
A2	DQ873811	Índia	2006	<i>Columba livia</i>
A2	KC017977	Espanha	2000	<i>Alectoris rufa</i>
A3	KC017984	Coreia do Sul	2013	<i>Bubo bubo</i>
A3	KC017983	Coreia do Sul	2012	<i>Bubo bubo</i>
A3	AM050392	Reino Unido	2006	<i>Thalassarche melanophris</i>
A3	AM050376	Reino Unido	2006	<i>Falco berigora</i>
A3	JN615018	Argentina	2007	<i>Spheniscus magellanicus</i>
A3	KC017987	Argentina	2007	<i>Spheniscus magellanicus</i>
A3	KC017985	EUA	1991	<i>Uria aalge</i>
A3	KC017982	EUA	1989	<i>Phalacrocorax pelagicus</i>
A3	LC481450	Japão	2017	<i>Phalacrocorax capillatus</i>
A3	LC481471	Japão	2017	<i>Phalacrocorax capillatus</i>
A3	LC481451	Japão	2017	<i>Phalacrocorax capillatus</i>
A3	KF956003	Alemanha	2004	<i>Haliaetus albicilla</i>
A3	KF956000	Alemanha	2004	<i>Grus grus</i>
A3	KC017981	Antártica	2004	<i>Macronectes giganteus</i>
A3	KC017986	EUA	1983	<i>Phoebastria immutabilis</i>
A4	AY530306	Emirados Árabes	2004	<i>Falco berigora</i>
A4	KF956002	Alemanha	2001	<i>Falco peregrinus</i>
A4	KC017988	Hungria	2005	<i>Falco peregrinus</i>
A1	HM623675	China	2010	<i>Gallus gallus</i>
A1	GU108500	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175275	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175261	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MG601781	Brasil	2016	Vacina
A1	MH175252	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175293	EUA	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175276	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175255	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MF140450	Irã	2017	Vacina
A1	MH175250	EUA	2013	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	JX464820	Egito	2011	<i>Gallus gallus</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
A1	AM050379	Reino Unido	2005	Vacina
A1	AM050380	Reino Unido	2006	<i>Gallus gallus</i>
A1	GQ180207	Itália	2010	<i>Phasianidae</i> sp.
A1	MK651860	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	FR852585	Áustria	2011	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MW147745	Egito	2018	<i>Gallus gallus</i>
A1	MN971579	Iraque	2019	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175279	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH106510	Irã	2018	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175267	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	GU108501	Áustria	2007	<i>Gallus gallus</i>
A1	MK651858	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	GU108505	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175287	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175286	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	KJ809101	Egito	2014	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175288	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175264	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175277	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MK651859	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	KC017964	Hungria	2005	<i>Crossoptilon auritum</i>
A1	AY530307	Alemanha	2004	<i>Passer domesticus</i>
A1	MH175245	Canadá	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175285	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175249	Canadá	2018	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	GU108507	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175270	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MK651861	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175253	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175222	EUA	2009	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175243	Canadá	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175223	EUA	2008	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175295	Canadá	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175256	Canadá	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	GU108502	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175258	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175248	Canadá	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MK651852	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	KF548037	Índia	2013	<i>Gallus gallus</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
A1	MH175284	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175266	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175259	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175292	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175251	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175283	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175281	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175246	Canadá	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	JQ665838	Egito	2011	<i>Gallus gallus</i>
A1	JX464819	Egito	2011	<i>Gallus gallus</i>
A1	FR852586	Áustria	2011	<i>Gallus gallus</i>
A1	GU108503	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	MK651854	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175271	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	AY530304	Alemanha	2004	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	KC017961	EUA	2005	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175232	Canadá	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	DQ873808	Índia	2006	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	GU108508	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175294	EUA	2017	<i>Corvus brachyrhynchos</i>
A1	EF568377	EUA	2007	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175247	Canadá	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175272	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175231	Canadá	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	JQ665839	Egito	2012	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MK651857	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	MK651853	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	JX464821	Egito	2011	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175280	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175273	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	AY530302	Alemanha	2004	Vacina
A1	GQ180212	Itália	2010	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175265	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175233	Canadá	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	KT003289	Irã	2015	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175257	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175235	Canadá	2011	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175244	Canadá	2017	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175274	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>

ANEXO II – Continuação.

Clado	NCBI	País	Ano Pub.	Espécie isolada
A1	MH175260	EUA	2014	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	GU108504	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175268	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MH175291	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	GU108506	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	KF032407	Tanzânia	2010	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175290	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MN915017	Iraque	2019	<i>Gallus gallus</i>
A1	MK651856	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	KU522209	Irã	2015	<i>Gallus gallus</i>
A1	KC017960	Hungria	2003	<i>Gallus gallus</i>
A1	MG601782	Brasil	2016	Vacina
A1	MH175282	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	KF548036	Índia	2013	<i>Gallus gallus</i>
A1	GU108509	Áustria	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	KU522210	Irã	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	AM050378	Austrália	2006	<i>Gallus gallus</i>
A1	KC017962	EUA	1996	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175289	EUA	2016	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	M25781	EUA	1989	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH175269	EUA	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	MK651855	Brasil	2017	<i>Gallus gallus</i>
A1	GQ180201	Itália	2009	<i>Perdix perdix</i>
A1	AB292647	Japão	1985	<i>Lagopus mutus japonicus</i>
A1	KU212807	Irã	2015	<i>Gallus gallus</i>
A1	KT003290	Irã	2015	<i>Meleagris gallopavo</i>
A1	AM050377	Reino Unido	2006	<i>Gallus gallus</i>
A1	MH286510	Brasil	2014	<i>Anas querquedula</i>
A1	EF568398	EUA	2008	<i>Gallus gallus</i>
A1	KT003288	Irã	2015	<i>Gallus gallus</i>