

SANDRA YULIET MARÍN GÓMEZ

**Anemia Infecciosa das Galinhas em Minas Gerais: Diversidade Genética e Epidemiologia Molecular**

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.  
Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva e Epidemiologia

Orientador: Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2012

M337a Marín Gómez, Sandra Yuliet, 1979-  
Anemia infecciosa das galinhas em Minas Gerais: diversidade genética e epidemiologia molecular / Sandra Yuliet Marín Gómez. – 2012.  
96 p. : il.

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

1. Galinha – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa em aves – Teses. 3. Virologia veterinária – Teses. I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 96

Tese defendida e aprovada em 24 de fevereiro de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



---

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins  
Presidente



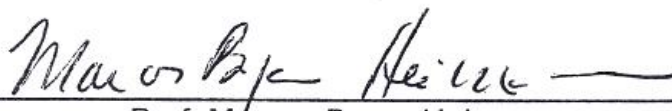
---

Prof.ª Friscilla Rochele Barrios



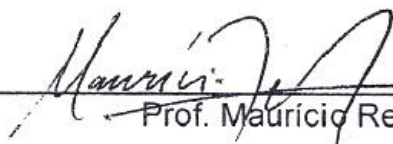
---

Prof.ª Adriana Dias Gomes



---

Prof. Marcos Bryan Heinemann



---

Prof. Mauricio Resende



À minha família que me apoiou e sempre acreditou na minha capacidade. À minha mãe, exemplo de uma mulher lutadora. Ao Marcos, meu grande amor. A eles... dedico este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo.

A Escola de Veterinária e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e a UFMG.

A meu orientador Nelson Rodrigo da Silva Martins, pela orientação, dedicação, confiança, amizade, ensinamentos, respeito, carinho e principalmente por sua bondade com todas as pessoas.

A minha mãe Maria Dóris, por todo o amor, apoio e confiança em mim depositados. Por sempre acreditar em mim. A meu pai José Joaquin, pelo carinho, a vida e pelos ensinamentos.

A minha irmã Maria Aydée, pelo apoio, amor e confiança. A minha sobrinha Juliana, por existir e me dar muitas alegrias.

A meu querido esposo Marcos Orlando pelo amor, apoio, paciência e ensinamentos.

A minha irmã de coração Yasmine Barbosa pelo apoio e carinho. Ao meu grande amigo Daniel Vilela pela amizade, carinho, apoio e ajuda.

Ao professor José Sérgio Resende pela orientação, amizade e ajuda.

Ao professor Maurício Resende, pela orientação, amizade e pela participação na banca examinadora.

À professora Priscilla R. Barrios pela amizade, ajuda, conhecimentos e pela participação na banca examinadora.

Ao professor Marcos Bryan Heinemann, pela ajuda, conselhos, orientações e pela participação na banca examinadora.

À Doutora Adriana Dias Gómez pela ajuda, conselhos e participação na banca examinadora.

À professora Josiane Tavares de Abreu pela participação na banca examinadora.

À professora Bernadete Miranda dos Santos pelas orientações e colaboração com este projeto.

Aos funcionários do laboratório de doenças das aves Cláudio e Alexis, pela colaboração e amizade.

Ao André A. Fernandes do laboratório de bacteriologia pelos conselhos, ajuda e amizade.

A meus colegas e amigos do Laboratório de Doenças das Aves: Renata, Flávio, Daniele, Alexandra, Francisco, Rogério, Marcela, Carolina, Mariana e Rodrigo pela amizade, ajuda e apoio.

A minha querida amiga Patrícia do laboratório de Malaria, pela ajuda, conselhos e carinho.

A meus amigos e conterrâneos pela amizade e carinho Ana Maria, Carolina Jaramillo e Raul.

Ao Daniel e ao Bruno do laboratório de Genética da Escola de Veterinária pela importante colaboração com este projeto.

A todos os amigos e funcionários da Escola de Veterinária, por sua compreensão, paciência e colaboração.

A CAPES/CNPq Programa de Estudante-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG) pela bolsa de estudos.

“Triste não é mudar de idéias. Triste é não ter idéias para mudar” (Barão de Itararé)

“Morre lentamente quem não muda de marca, não se arrisca a vestir uma nova cor ou não conversa com quem não conhece” (Pablo Neruda).



## RESUMO

Descreve-se um estudo de ocorrência do genoma do vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) na avicultura industrial, familiar, como contaminante em algumas vacinas comerciais para galinhas e a ausência em várias espécies de aves silvestres. O estudo foi conduzido entre 2006 e 2011 e, em aves industriais incluiu 74 granjas, sendo 54 de frangos de corte e 20 de poedeiras comerciais, de diferentes mesorregiões do estado de Minas Gerais. Em aves da avicultura familiar, foram testadas galinhas de diferentes localidades, de 74 propriedades rurais, com e sem sinais clínicos da doença. Vacinas comerciais (n=40) produzidas na década de 1990 foram também investigadas. O DNA de CAV foi detectado por semi-nested PCR em 36,4% das granjas de frangos de corte da avicultura industrial e em 35% das propriedades da avicultura familiar e em sete vacinas vivas (17,5%) para a avicultura produzidas entre 1991 e 1998 para a prevenção de encefalomielite aviária, doença de Marek ou doença de Newcastle. A região que codifica parcialmente a proteína VP1 de CAV, encontrada em dez amostras provenientes da avicultura industrial e em sete amostras da avicultura familiar, foi caracterizada geneticamente através de sequenciamento. Para isto foram utilizadas duas PCRs que amplificam dois fragmentos diferentes do DNA de CAV. Juntos os fragmentos consistem em 1271 nucleotídeos que codificam parcialmente a proteína VP1. As sequências apresentaram similaridade de nucleotídeos de 93,7 a 99,5%, quando comparadas com 20 sequências de diferentes partes do mundo, disponibilizadas no GenBank, e a similaridade em aminoácidos deduzidos variou entre 96,6 e 100%. Em sequências de três amostras originárias de frangos de corte da Zona da Mata de Minas Gerais e da região metropolitana de Belo Horizonte, foi encontrado o aminoácido F na posição 98, substituição que parece ser típica de estirpes brasileiras. Substituições de aminoácidos também foram observadas nos resíduos das posições 22, 75, 97, 139, 144, 287 e 370 do gene de VP1 das estirpes estudadas. Os altos índices de ocorrência de CAV, semelhantes a estudos anteriores, aqui encontrados em taxas semelhantes em aves intensificadas e não intensificadas, podem ser indicativos de circulação do vírus entre as diferentes atividades avícolas em Minas Gerais. Os resultados em galinhas da avicultura industrial e de subsistência e de CAV contaminante de vacinas vivas podem representar fatores-chave da epidemiologia de CAV.

**Palavras Chaves:** Vírus da anemia infecciosa das galinhas, CAV, epidemiologia molecular, diversidade genética, contaminação de vacinas.

## ABSTRACT

A study of the occurrence of chicken anemia virus (CAV) in broiler and layer chickens of the poultry industry, backyard chickens, and as a contaminant in commercial vaccines for chickens was carried out. The study was conducted in 2006-2011 and included 74 industrial poultry farms, being 54 broiler and 20 layer chickens, and 74 properties of backyard poultry, in different localities in the state of Minas Gerais, with and without clinical signs of disease. Commercial poultry vaccines (n=40) were also investigated. CAV DNA was detected by semi-nested PCR in 36.4% of industrial poultry farms, in 35% of the properties of backyard chickens and in 17.5% of live vaccines against avian encephalomyelitis, Marek's or Newcastle disease. CAV genetic regions that encode part of the VP1 protein, found in samples of ten farms from the poultry industry, and in seven properties of backyard chickens, were amplified, producing fragments of 1,271 nucleotides and were sequenced. The nucleotide sequences showed similarities from 93.7 to 99.5%, as compared with 20 sequences from different parts of the world in GenBank, and the deduced amino acid similarity ranged from 96.6 to 100%. In sequences of three strains obtained from broilers of regions Zona da Mata and the metropolitan region of Belo Horizonte (Minas Gerais), the amino acid F was found at position 98, substitution which appears to be typical of Brazilian strains. Amino acid substitutions were observed in the residues of positions 22, 75, 97, 139, 144, 287 and 370 of the CAV VP1 gene. The high rates of occurrence, similar to previous studies, here additionally demonstrated to be at similar rates in industrial and free-range chickens, may be indicative of CAV circulation among different poultry activities in Minas Gerais. The presence of CAV contaminant in vaccines may have been a complicating factor in CAV epidemiology, favoring dissemination and diversity. The chicken status and vaccine contamination results may have represented key factors in the epidemiologic history of CAV.

**Keywords:** Chicken infectious anemia, CAV, molecular epidemiology, genetic diversity, vaccine contamination.

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA .....	19
CAPITULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....	21
1. Histórico.....	21
2. A doença.....	21
3. Características gerais do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas.....	22
4. Isolados .....	23
5. Características moleculares do CAV.....	24
6. Diversidade Genética do CAV e Sequenciamento.....	24
7. Patogenia .....	26
8. Epidemiologia .....	27
9. A doença no Brasil .....	28
10. Ocorrência do CAV em outras partes do mundo .....	28
11. Interação com outros agentes imunodepressores .....	29
11.1 CAV e o vírus da doença de Marek .....	29
11.2 CAV e Reovirus .....	29
11.3 CAV e o Vírus da doença Infecciosa Bursal (VDIB) .....	29
12. Diagnóstico .....	29
13. Controle.....	31
14. Referências Bibliográficas .....	31
CAPITULO II - OBJETIVOS.....	38
1. Objetivo Geral.....	38
2. Objetivos Específicos.....	38
CAPITULO III- MATERIAL E MÉTODOS.....	39
1. Laboratórios .....	39
2. Amostras Clínicas .....	39

3. Comitê de ética.....	39
5. Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA.....	44
6. Oligonucleotídeos Iniciadores.....	44
7. Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e semi-nested-PCR para detecção do CAV e da região genômica que codifica a proteína VP1 (Fragmento B).....	45
8. Sequenciamento do gene VP1.....	45
9. Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para sequenciamento da região genômica que codifica a proteína VP1 do CAV (Fragmento A).....	45
10. Análise dos produtos amplificados.....	47
11. Purificação dos produtos da PCR com polietilenoglicol (PEG).....	47
12. Sequenciamento genético.....	47
13. Análise das sequências nucleotídicas.....	47
14. Busca das sequências similares em bancos de dados.....	48
15. Alinhamento das sequências.....	48
16. Análises filogenéticas.....	48
17. Referencias Bibliográficas.....	48
<b>CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM AVES DE SUBSISTÊNCIA E DA AVICULTURA INDUSTRIAL EM MINAS GERAIS.....</b>	
Resumo.....	50
Introdução.....	50
Material e Métodos.....	51
Resultados e Discussão.....	53
Conclusão.....	70
Referencias Bibliográficas.....	71
<b>CAPITULO V - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS CONTAMINANTE DE VACINAS COMERCIAIS PRODUZIDAS NA DÉCADA DE 90.....</b>	
Resumo.....	74

Introdução .....	74
Material e Métodos .....	75
Resultados e Discussão .....	79
Referências Bibliográficas .....	86
CAPITULO VI - VIRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM OTRAS ESPECIES DE AVES.. 92	
Resumo.....	92
Introdução .....	92
Material e Metodos .....	93
Resultados e discussão .....	95
Conclusão.....	95
Referências Bibliográficas .....	95

## LISTA DE FIGURAS

		Pagina
	<b>CAPITULO I - REVISÃO DA LITERATURA</b>	
Figura 1-	A. Representação esquemática da organização do genoma do CAV B. Representação esquemática da estrutura tridimensional do CAV.....	23
Figura 2-	Representação esquemática da patogênese do CAV, demonstrando quais células do sistema imune são infectadas pelo vírus.....	27
	<b>CAPITULO III- MATERIAL E MÉTODOS</b>	
Figura 1-	Fluxograma das etapas executadas durante o desenvolvimento desta tese.....	43
Figura 2-	Representação esquemática da organização do CAV e a posição dos iniciadores na VP1.....	46
	<b>CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM AVES DE SUBSISTÊNCIA E DA AVICULTURA INDUSTRIAL EM MINAS GERAIS</b>	
Figura 1-	Eletroforese de DNA em gel de Agarose 1,5%.....	54
Figura 2-	Arvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método <i>neighbor-joining</i> com as sequencias de nucleotídeos (1271) geradas neste estudo para parte do segmento codificante de VP1 de CAVs.....	60
Figura 3-	Arvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método <i>neighbor-joining</i> com as sequencias geradas neste estudo (1.271 nucleotídeos) e as sequencias das estirpes vacinais do GenBank* de parte do segmento codificante da VP1 de CAVs.....	61
Figura 4-	Arvore filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método <i>neighbor-joining</i> com as sequencias do GenBank, alem das geradas neste estudo (1.271 nucleotídeos) para parte do segmento codificante de VP1 de CAVS.....	62
Figura 5-	Arvore filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método <i>neighbor-joining</i> com as sequências de aminoácidos (423aa) geradas neste estudo de parte de VP1 de CAV da avicultura familiar e industrial de Minas Gerais e as obtidas do GenBank.....	65
	<b>CAPITULO V - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS CONTAMINANTE DE VACINAS COMERCIAIS PRODUZIDAS NA DÉCADA DE 90</b>	
Figura 1-	Arvore filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método <i>neighbor-joining</i> com as sequências dos CAVs contaminantes de vacinas e as sequências disponíveis no GenBank da região hipervariável do CAV (675 nucleotídeos).....	82
Figura 2-	Arvore filogenética das estirpes de CAV contaminante de vacinas comerciais, amostras brasileiras e de outras partes do mundo disponíveis no GenBank com base no segmento de 225 aminoácidos da região hipervariável da VP1.....	83

## LISTA DE TABELAS

		Pagina
	<b>CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM AVES DE SUBSISTÊNCIA E DA AVICULTURA INDUSTRIAL EM MINAS GERAIS</b>	
Tabela 1-	Percentual de co-infecção de CAV e outros agentes diagnosticados no Laboratório de Doenças das Aves da Escola Veterinária da UFMG (2006-2011) em porcentagens.....	56
Tabela 2-	Identidade (em %) entre 423 aminoácidos deduzidos da VP1 das estirpes mineiras de CAV e de outras partes do mundo.....	59
Tabela 3-	Identidade (em %) de nucleotídeos (1271) e aminoácidos (423aa) deduzidos da VP1 entre as sequências obtidas de Minas Gerais.....	59
Tabela 4-	Similaridade (em %) entre 1271 nucleotídeos das sequências obtidas neste estudo de CAV e de outras partes do mundo (GenBank).....	63
	<b>CAPITULO V - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS CONTAMINANTE DE VACINAS COMERCIAIS PRODUZIDAS NA DÉCADA DE 90</b>	
Tabela 1-	Identidade dos nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) das sequências de CAV contaminante de vacinas comerciais (*), estirpes brasileiras e de outras partes do mundo disponíveis no GenBank.....	85

## LISTA DE QUADROS

		Pagina
<b>CAPITULO III- MATERIAL E MÉTODOS</b>		
Quadro 1-	Numero de propriedades avaliadas para detecção do CAV na Avicultura industrial e familiar e sua distribuição por Mesorregiões.....	40
Quadro 2-	Vacinas aviárias comerciais de vírus vivo atenuado e inativadas utilizadas no presente estudo para detecção de parte do genoma do CAV (VP1).....	41
Quadro 3-	Amostras clínicas obtidas de diferentes espécies de aves silvestres avaliadas para detecção de parte do genoma de CAV.....	42
Quadro 4-	Resumo dos iniciadores usados neste estudo para detecção de parte do genoma e para o sequenciamento da região que codifica a proteína VP1 do CAV (sequência de bases, localização no genoma e tamanho esperado).....	46
<b>CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM AVES DE SUBSISTÊNCIA E DA AVICULTURA INDUSTRIAL EM MINAS GERAIS</b>		
Quadro 1-	Resumo dos iniciadores usados neste estudo para detecção do genoma e para sequenciamento da região que codifica a proteína VP1 do CAV.....	52
Quadro 2-	Histórico clínico-patológico dos plantéis dos quais estirpes de CAV foram sequenciadas em Minas Gerais.....	57
Quadro 3-	Relação das estirpes de CAV de referência.....	64
Quadro 4-	Substituição de aminoácidos na proteína VP1 do CAV das sequencias de Minas Gerais e as obtidas do GenBank, utilizando como consenso estirpe Cuxhaven-1 (423aa).....	67
<b>CAPITULO V - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS CONTAMINANTE DE VACINAS COMERCIAIS PRODUZIDAS NA DÉCADA DE 90</b>		
Quadro 1-	Vacinas aviárias comerciais de vírus vivo atenuado e inativadas utilizadas no presente estudo para detecção de parte do genoma do CAV (VP1).....	76
Quadro 2-	Iniciadores para detecção e sequenciamento do CAV.....	77
Quadro 3-	Vacinas contaminadas com o genoma de CAV.....	79
Quadro 4-	Vacinas aviárias atenuadas e positivas para parte do genoma do CAV e usadas no sequenciamento.....	79
Quadro 5-	Substituição de aminoácidos na região hipervariável da proteína VP1 (225aa) de estirpes de CAV detectadas como contaminante de vacinas com sequências deduzidas e as disponíveis no GenBank usando a estirpe Cux-1 como consenso.....	81
Quadro 6-	Relação das estirpes de CAV disponíveis no GenBank usadas nas análises por instrumentos de bioinformática neste estudo.....	84
<b>CAPITULO VI - VIRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM OUTRAS ESPECIES DE AVES.</b>		
Quadro 1-	Amostras clínicas obtidas de diferentes espécies de aves silvestres avaliadas para detecção de parte do genoma de CAV.....	94
Quadro 2-	Iniciadores para detecção do CAV.....	95



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>A</b>	Alanina
<b>aa</b>	Aminoácidos.
<b>CAV</b>	( <i>Chicken anemia virus</i> ) Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas
<b>CD4<sup>+</sup></b>	Cluster de Diferenciação 4
<b>CD8<sup>+</sup></b>	Cluster de Diferenciação 8
<b>C-terminal</b>	Carboxil-terminal
<b>D</b>	Acido Aspártico
<b>DIB</b>	Doença Infecciosa Bursal
<b>DNA</b>	Ácido Desoxirribonucléico
<b>E</b>	Acido Glutâmico
<b>EDTA</b>	Ácido Etileno Diamino Tetracético
<b>ELISA</b>	( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> ) Ensaio Imunoenzimático em Fase Sólida
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>F</b>	Fenilalanina
<b>G</b>	Glicina
<b>g</b>	Gramma
<b>H</b>	Histidina
<b>I</b>	Isoleucina
<b>ICTV</b>	( <i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i> ) Comitê Internacional de Taxonomia dos Virus.
<b>IFI</b>	Imunofluorescência Indireta
<b>IPI</b>	Imunoperoxidase Indireta
<b>K</b>	Lisina
<b>kb</b>	Quilobase
<b>Kda</b>	Quilodalton
<b>L</b>	Leucina
<b>M</b>	Metionina
<b>MDCC-MSB-1</b>	( <i>Chicken hematopoietic lymphoblast cell line</i> ) Linhagem de células linfoblastóides de galinhas, derivadas do tumor da doença de Marek.
<b>M.O.</b>	Medula Óssea
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mm<sup>3</sup></b>	Milímetro Cúbico
<b>N</b>	Asparagina
<b>NCBI</b>	( <i>National Center for Biotechnology Information</i> ) Centro Nacional para a Informação Biotecnológica.
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>nt</b>	Nucleotídeo
<b>ORF</b>	( <i>Open Reading Frame</i> ) Fase de Leitura Aberta
<b>P</b>	Prolina
<b>pb</b>	Pares de Bases
<b>PCR</b>	( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ) Reação em Cadeia pela Polimerase
<b>PEG</b>	Poli(et)ilenoglicol
<b>pH</b>	Potencial Hidrogeniônico
<b>PIB</b>	Produto Interno Bruto
<b>Q</b>	Glutamina

<b>R</b>	Arginina
<b>S</b>	Serina
<b>SN</b>	Soroneutralização
<b>SPF</b>	( <i>Specific Pathogen Free</i> ) Aves Livres de Patógenos Específicos
<b>T</b>	Treonina
<b>TBE</b>	Tris-Borato-EDTA
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>UBABEF</b>	União Brasileira de Avicultura e Associação Brasileira dos Exportadores de Frango
<b>UFMG</b>	Universidade Federal de Minas Gerais
<b>UFV</b>	Universidade Federal de Viçosa
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Valina
<b>VN</b>	Vírus Neutralização
<b>W</b>	Triptofano
<b>Y</b>	Tirosina
<b>μL</b>	Microlitro

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A avicultura industrial tem uma posição de destaque na economia brasileira, empregando mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O frango brasileiro é líder em nível mundial, e está presente em mais de 150 países em todo o mundo, fornecendo proteína de origem animal de alto valor nutricional e baixo custo. O Brasil é o maior exportador de frango de corte do mundo e o terceiro maior produtor (UBABEF, 2010).

Nos últimos anos a nutrição, genética, biossegurança e o diagnóstico das principais doenças têm evoluído. Entretanto, algumas doenças imunodepressoras causam perdas econômicas consideráveis, entre elas a Anemia Infecciosa das Galinhas. Esta atinge principalmente aves jovens, podendo afetar também aves de outras idades, sendo caracterizada por severa anemia, atrofia generalizada de órgãos linfóides, retardo no crescimento, imunodepressão e mortalidade variável (Schat e Van Santen, 2008). A doença está frequentemente complicada por infecções secundárias provocadas por vírus, bactérias, fungos e parasitos, o que aumenta significativamente os custos de produção com tratamentos, falhas na vacinação e condenação ao abate e por diminuição do crescimento e piora da conversão alimentar em frangos de corte (McNulty *et al.*, 1989; Todd, 2004; Schat, 2009). CAV e síndromes associadas são conhecidas por síndrome hemorrágica e/ou anemia aplástica, dermatite gangrenosa, hepatite por corpúsculos de inclusão são uma ameaça importante à indústria de frangos e na produção de ovos SPF (McNulty, 1991; Toro *et al.*, 2009)

A espécie *Gallus gallus domesticus* é a única hospedeira natural conhecida do vírus

e muitos aspectos de sua epidemiologia não estão totalmente esclarecidos, como, por exemplo, a possibilidade de ocorrência do vírus em outras espécies de aves domésticas e silvestres, como pombos, patos, avestruzes, papagaios e pássaros (Barrios, 2009).

No Brasil, estudos sorológicos em matrizes mostraram que o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) está amplamente disseminado na avicultura industrial, com alta prevalência nas regiões onde há alta densidade avícola (Brentano *et al.*, 2000; Canal *et al.*, 2004; Gomes *et al.*, 2005). Brentano *et al.* (2005), utilizando métodos sorológicos e moleculares como “*nested-PCR*”, comprovaram a persistência de CAV nas gônadas das galinhas com presença de altos títulos de anticorpos neutralizantes ou protetores nas aves, demonstrando que a transmissão do vírus ao embrião pode ocorrer independentemente do nível de anticorpos neutralizantes nas matrizes e que o vírus pode ficar latente nos tecidos reprodutores destas matrizes. O agente também foi detectado nos tecidos das gônadas na ausência de soroconversão (Cardona *et al.*, 2000a). A infecção do embrião também pode ser transmitida pelo sêmen (Hoop, 1993).

O diagnóstico do CAV tem sido feito rotineiramente através de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para pesquisar a presença de anticorpos nos plantéis ou por isolamento do vírus (Gomes *et al.*, 2005; Brentano *et al.*, 2000). O ELISA comercial, normalmente só detecta anticorpos da classe IgG, mas não a presença de anticorpos IgM indicadores de infecções recentes. O isolamento *in vitro* tem algumas limitações, entre elas o tempo requerido para o cultivo, que normalmente vai de dias a semanas, enquanto a confirmação da presença do CAV somente

pode ser feita após várias passagens do vírus em células específicas. A amplificação do DNA por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma técnica sensível e específica para detecção da presença do DNA viral. A caracterização do produto da PCR por sequenciamento e a análise destas sequências com ajuda da bioinformática, podem prover importantes informações epidemiológicas e evolutivas dos microrganismos, tendo se tornado uma técnica de fácil e rápida execução (Tham e Stanislawek, 1992; Ducatez *et al.*, 2006; Barrios *et al.*, 2009).

Cardona *et al.* (2000a) desenvolveram uma *nested PCR* para diagnóstico do CAV, que consiste na reamplificação do produto da PCR, por meio do uso de oligonucleotídeos dirigidos para uma região interna, para aumentar a sensibilidade da técnica. Neste trabalho, foi usada a técnica da *semi-nested*, na qual se utiliza um dos iniciadores externos usados na primeira reação (PCR) e um iniciador interno na reamplificação. Estas técnicas aumentam a sensibilidade e podem ser usadas no diagnóstico da doença subclínica, nas quais pequenas quantidades do genoma viral podem ser detectadas

(Cardona *et al.*, 2000a; Simionatto *et al.*, 2006).

Esse trabalho teve como objetivo pesquisar parte do genoma que codifica a proteína VP1 pela *semi-nested PCR* em aves da avicultura industrial, familiar, silvestres e exóticas. O DNA de 17 *amplicons* da avicultura familiar e industrial foram sequenciados e comparados com sequências disponibilizadas no GenBank. Também foram sequenciados três DNAs de CAV amplificados de vacinas comerciais e comparados com sequências disponibilizadas no Brasil e em outras partes do mundo para estabelecer possíveis relações geográficas e buscar um melhor conhecimento da epidemiologia do vírus. A aplicação do sequenciamento de CAV e sua análise por bioinformática é importante para detectar diferenças dos CAVs circulantes em Minas Gerais e no Brasil, já que esta técnica permite uma maior discriminação entre diversas amostras ou isolados virais que outras como o RFLP, tornando mais acurada a epidemiologia molecular de doenças virais (Miyaki *et al.*, 2001).

## CAPITULO I - REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Histórico

Em 1979 o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) foi descrito pela primeira vez por Yuasa e colaboradores no Japão, durante a investigação de um caso de falhas vacinais pelo vírus de Marek em frangos de corte, como um agente filtrável e transmissível, que produzia severa anemia, atrofia dos órgãos linfóides das aves e aplasia da medula óssea. A doença, entretanto, já tinha sido descrita anteriormente por Jakowski em 1970 (Schat e Van Santen, 2008), de forma errada, como uma anemia severa, causada pela doença de Marek.

Este vírus foi denominado como Agente da Anemia das Galinhas (CAA, *chicken anemia agent*) amostra Gifu-1 por Yuasa *et al.* (1979). Após caracterização bioquímica e morfológica por microscopia eletrônica, sua denominação passou a ser vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), de acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV, 2006). No Brasil, Brentano *et al.* (1991) isolaram e identificaram por meio de anticorpos monoclonais específicos o CAV, pela primeira vez, em frangos de corte que apresentavam sinais de anemia, atrofia dos órgãos linfóides, desuniformidade, imunodepressão e baixos índices produtivos.

Toro *et al.* (2006) fizeram um levantamento epidemiológico por meio de testes sorológicos em lotes de aves adultas que eram usadas na experimentação na Universidade de Auburn nos Estados Unidos em amostras de soro colhidas entre 1959 e 1975 e detectaram anticorpos na maior parte das amostras, variando entre 43% a 100% nos diferentes anos testados,

sugerindo que a ocorrência do vírus é anterior ao seu primeiro isolamento.

O CAV já foi identificado e caracterizado em várias partes do mundo, confirmando sua presença em diferentes criações de aves comerciais, de subsistência e no comércio de aves vivas (Ducatez *et al.*, 2008; Oluwayelu e Todd, 2008; Barrios *et al.*, 2009; Craig *et al.*, 2009).

### 2. A doença

O vírus tem importante papel na etiologia de muitas doenças por ser um vírus imunodepressor, como na síndrome hemorrágica, na dermatite gangrenosa, na doença da asa azul e outras doenças bacterianas e parasitárias (Von Bülow e Schat, 1997). A característica notável da infecção é sua alta contagiosidade, resistência e natureza ubíqua com um potencial para produzir imunodepressão, demonstrada na inoculação experimental de aves SPF (Smyth *et al.*, 1993; Tan e Tannock, 2005; Haridy *et al.*, 2009).

Os sinais clínicos do CAV com frequência aparecem em aves jovens, com duas a cinco semanas de idade, causando grandes perdas econômicas especialmente em frangos de corte, os quais geralmente adquirem a infecção por via vertical. As lesões características da doença são: severa anemia aplástica, trombocitopenia, atrofia generalizada de órgãos linfóides, hemorragias no tecido subcutâneo e intramuscular e aumento da mortalidade. Outras lesões encontradas são medula óssea pálida e fígado aumentado e pálido (Schat e Van Santen, 2008). Miles *et al.* (2001) reproduziram o quadro clínico de retardo no crescimento e mortalidade de 10 a 20% em frangos de corte, percebendo, ainda, agravamento do quadro na presença de infecções secundárias ou oportunistas, como colibacilose e coccidiose. Aves com mais de três semanas de vida podem

desenvolver sinais clínicos e lesões persistentes quando o sistema imune está comprometido com outros agentes imunodepressores, como, por exemplo, vírus da Doença Infecciosa Bursal (VDIB), Marek, Reovírus e Adenovírus, incrementando a patogenicidade destes agentes (Rosenberger e Cloud, 1989; McNeilly *et al.*, 1995; Haridy *et al.*, 2009; Toro *et al.*, 2009). Nestes casos, está dificultada a resposta imune efetiva contra o CAV, porque as células B e suas precursoras são as principais células da resposta frente ao vírus, principalmente pela produção de anticorpos (Imai *et al.*, 1999; Adair, 2000; Todd, 2004).

A forma mais frequente da infecção é a subclínica e geralmente acontece em aves adultas ou quando as aves são infectadas com mais de três semanas de idade. Apesar dos sinais clínicos serem discretos ou inexistentes nas aves adultas infectadas foi observado lesões histológicas no timo de frangos com três a seis semanas de vida, inoculados pela via oral. O sistema imune fica comprometido pela depleção linfocitária e a resposta imune contra infecções secundárias e oportunistas pode estar diminuída (McConnell *et al.*, 1993; Smyth *et al.*, 2006) e a resposta imune para as vacinas também fica reduzida (Sommer e Cardona, 2003; Todd, 2004).

A habilidade do CAV em produzir os sinais clínicos nas aves experimentalmente inoculadas e sua capacidade de disseminação horizontal, depende da inoculação de doses elevadas, enquanto doses menores reproduzem a doença com menor severidade (McNulty *et al.*, 1990; Tan e Tannock, 2005; Kaffashi *et al.*, 2006). Isso indica que a doença em campo pode variar de acordo com o título viral ao qual a ave está exposta (Brentano, 2009). Tan e Tannock (2005) inocularam pela via intramuscular e oral o CAV em aves SPF de um dia de idade para estudar a carga

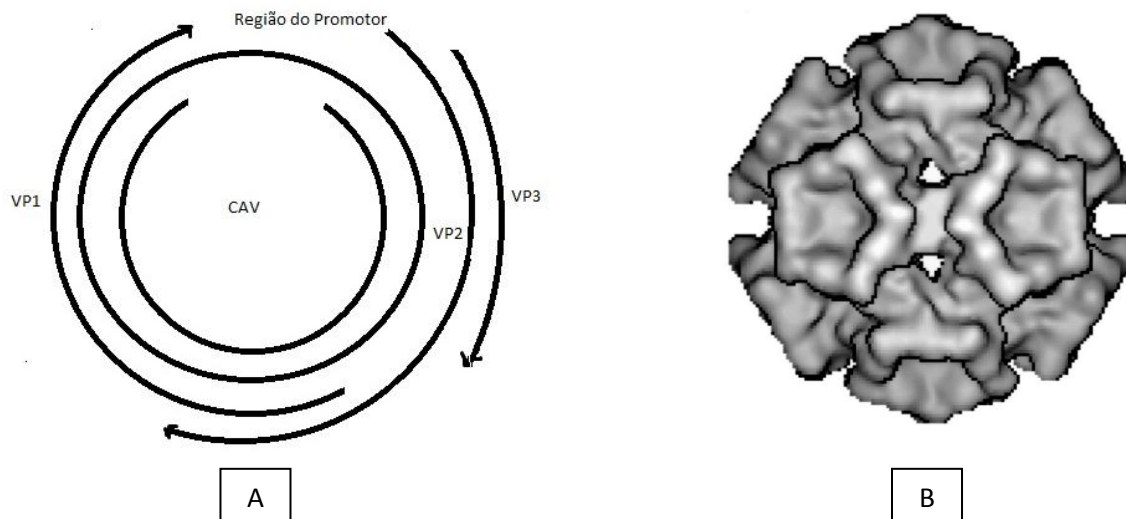
viral, a patogênese e a via de inoculação. Os autores concluíram que os sinais clínicos e as lesões são dose-dependentes e os sinais clínicos aparecem primeiro nas aves inoculadas pela via intramuscular que as infectadas pela via oral.

As lesões características da doença aparecem duas ou três semanas após a inoculação, e por isso, os surtos da doença ocorrem geralmente nas aves de duas a cinco semanas de idade (Yuasa *et al.*, 1979). As lesões também estão relacionadas ao tipo de infecção secundária presente ou à presença de outros agentes oportunistas ou imunodepressores (Todd, 2004; Toro *et al.*, 2009). Kaffashi *et al.* (2006) demonstraram que a patogenicidade de CAV pode replicar-se em muitos órgãos, como timo, baço e fígado, tanto em pintinhos infectados no primeiro dia de idade, como em aves inoculadas as 6 semanas pela via intraocular, atingindo o pico de concentração viral, respectivamente, 18 e 20 dias pós-infecção, quantificada através da PCR em tempo real.

### **3. Características gerais do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas**

O CAV é um pequeno vírus de 20 a 25nm de diâmetro, não envelopado, de morfologia icosaédrica, com genoma de DNA fita simples negativa circular, com aproximadamente 2,3 kb, com três janelas abertas de leitura (ORFs do inglês *open reading frame*), que codificam três proteínas. Pertence à família *Circoviridae* (Murphy *et al.*, 1999), da qual fazem parte o circovírus suíno, de pombo, de canário, de ganso e da doença do bico e das penas dos psitacídeos (BFDV), sendo o único membro do gênero *Gyrovirus* (Pringle, 1999). Os capsídeos do vírus possuem uma estrutura icosaédrica contendo 60 moléculas da proteína do capsídeo arranjadas em 12 unidades pentaméricas em

forma de trompete (Figura 1) (Crowther *et al.*, 2003).



**Figura 1.** A. Representação esquemática da organização do genoma do CAV. Morfologia icosaédrica, o qual é constituído por DNA de fita simples negativo com três janelas abertas de leitura localizadas na mesma fita que codifica três proteínas VP1, VP2 e VP3. B. Representação esquemática da estrutura tridimensional do CAV apresentando o capsídeo formado por 12 formas pentaméricas em forma de trompete (Adaptado de Todd, 2004 e Crowther *et al.*, 2003).

A partícula viral tem um coeficiente de sedimentação estimado em 91S em gradiente de sacarose. O CAV pode ser purificado em gradientes de cloreto de cério a uma densidade de 1.35 a 1.36 g/cm<sup>3</sup> (Gelderblom *et al.*, 1989; Von Bülow e Schat, 1997). O vírus é resistente a altas temperaturas, e é resistente a vários desinfetantes nas concentrações comumente utilizadas na avicultura brasileira.

#### 4. Isolados

Em geral, não existem diferenças antigênicas ou patogênicas significativas reportadas nos diferentes isolados de CAV, que é conhecido como um vírus com um único sorotipo e vários grupos genéticos

(Islam *et al.*, 2002). Yuasa e Imai (1986) compararam a patogenia de onze isolados do CAV no Japão, todos produziam anemia aplástica e mortalidade que oscilava entre 20-90% quando inoculados em pintinhos SPF de um dia de idade, os autores não observaram diferenças claras entre os isolados. Toro *et al.* (1997) descreveram o isolado 10343 como sendo mais virulento que outros isolados por ter produzido atrofia do timo e lesões histopatológicas no baço, fígado e na bolsa cloacal de frangos com dez semanas de idade. Entretanto, Spackman *et al.* (2002) encontraram diferenças antigênicas no isolado CAV7, sugerindo a existência de um segundo sorotipo de CAV, mas até o momento este não foi reconhecido.

## 5. Características moleculares do CAV

O genoma do CAV consiste de três ORFs, as quais se sobrepõem parcialmente e codificam suas proteínas (Schat e Van Santen, 2008). O genoma também consiste de uma região promotora e um sinal de poliadenilação (Noteborn *et al.*, 1992). A região promotora contém o TATA *box* que está localizada no nucleotídeo 324, e contém outros elementos regulatórios de significativa importância; o sítio de poliadenilação está localizado no nucleotídeo 2317.

Todas as ORFs localizam-se na mesma fita de DNA (Meehan *et al.*, 1992; Noteborn *et al.*, 1992). A ORF 3 com 1347 nucleotídeos, que codifica a maior proteína (51,6 kDa) VP1 encontrada no vírus purificado é a proteína estrutural do vírus, compõe o cápsídeo viral e a que apresentam maior variabilidade genética e por isto tem sido mais usada para caracterização do vírus em estudos moleculares (Noteborn *et al.*, 1992; Craig *et al.*, 2009). Wang *et al.* (2009) detectaram na VP1 seleção positiva usando o método de análise filogenética maximum-likelihood e detectaram oito sites com seleção positiva e encontraram relação entre o aa da posição 287 e a virulência do CAV. A VP1 contém na porção C-terminal, regiões ricas em GC e várias pequenas estruturas que formam grampos (*hairpins*) associados com a replicação em círculo rolante, e desempenha um papel importante na replicação viral (Crowther *et al.*, 2003).

A ORF 1, com 647 nucleotídeos que codifica a proteína VP2 (24 kDa) não estrutural, atua como um modelo estrutural (*scaffold*) na montagem do capsídeo viral com atividade fosfatase. Peters *et al.* (2002) definiram a VP2 como uma proteína fosfatase com dupla especificidade, que catalisa a remoção de fosfato tanto de substratos como de substratos. Proteínas fosfatases atuam na regulação da

mitogênese, transcrição gênica, interações celulares, na diferenciação celular e na resposta de citocinas de linfócitos. A VP2 é expressa em níveis basais durante a infecção viral o que poderia estar relacionado com sua atividade regulatória não estrutural (Peters *et al.*, 2002; Nogueira-Dantas *et al.* 2007). As proteínas VP1 e VP2 são os principais alvos dos anticorpos neutralizantes e sua coexpressão é necessária para a indução da resposta imune (Noteborn *et al.*, 1998). A VP2 junto com a VP3, também possui atividade apoptótica (Noteborn *et al.*, 1998; Noteborn *et al.*, 2004). A ORF 2 (363 nt) codifica a proteína VP3 de 13,6 kDa, também não estrutural denominada apoptina, com atividade apoptótica em células infectadas. A VP3 induz a morte de células seletivamente matando somente células transformadas. Este resultado parece estar relacionado com a localização da proteína no interior da célula, sendo que a apoptina encontrase em células primárias no citoplasma e em células tumorais no núcleo (Wang *et al.*, 2004). Peters *et al.* (2006) sugeriram que mutações em VP2 podem alterar o tráfico de VP3 para o núcleo na célula infectada, mostrando o importante papel da VP2 junto com a VP3 na patogenicidade do vírus sobre o hospedeiro.

## 6. Diversidade Genética do CAV e Sequenciamento

A sequência do genoma do CAV Cux-1 foi descrita pela primeira vez em 1990 (Noteborn *et al.*, 1991). Desde então, vários isolados de CAV com poucas e muitas passagens em cultivos celulares tem sido sequenciados e caracterizados (Islam *et al.*, 2002). Diferenças na sequência de isolados em várias partes do mundo já foram relatadas (Meehan *et al.*, 1992; Brown *et al.*, 2000; Chowdhury *et al.*, 2003). Oluwayelu *et al.* (2008) sequenciaram parcialmente a VP1 de três amostras oriundas de aves comerciais e



outras seis provenientes de galinhas de subsistência, tendo encontrado no máximo de 6 e 4% de diversidade, respectivamente.

Embora o genoma do CAV seja altamente conservado, comparações entre sequências do gene que codifica a VP1 de diferentes partes do mundo descreveram a presença de uma região hipervariável compreendida entre os aminoácidos 139 e 151. Renshaw *et al.* (1996) demonstraram que os aminoácidos na posição 139 e 144 têm um papel vital na replicação e disseminação deste vírus nas aves. Outras regiões de VP1 que apresentaram certo grau de variabilidade incluem a região compreendida entre os aminoácidos 248 e 254 (Renshaw *et al.*, 1996). O genoma da proteína VP1 do CAV é menos conservado que as proteínas VP2 e VP3 e em várias partes do mundo têm sido reportadas uma diversidade genética de aproximadamente 4,4% na substituição de nucleotídeos (Ducatez *et al.*, 2006). Ducatez *et al.* (2008) avaliaram a distância genética média dos nucleotídeos de 112 sequências da proteína VP1 de CAV isoladas de diferentes partes do mundo e encontraram 2,5% de diversidade entre as sequências, quando medida a distância entre amostras dos Estados Unidos a média foi de 2,9% e de 1,4% das estirpes da Europa.

Análises filogenéticas do segmento que codifica a proteína VP1 têm sido descritas por outros autores sendo relatada a distribuição das estirpes de CAV em três grupos distintos, chamados de genótipo A, B e C (He *et al.*, 2007). Da mesma maneira, Craig *et al.* (2009) analisaram filogeneticamente o genoma completo da VP1 de 18 isolados argentinos e, comparando com outras estirpes do GenBank, de forma similar aos genótipos classificados por He *et al.* (2007), observaram que as sequências também formaram 3 grupos genéticos. Os mesmos autores consideraram que todos os isolados

argentinos se agruparam no genótipo B. Craig *et al.* (2009) sugeriram que a caracterização pela genotipificação da proteína VP1 é útil para tipificação deste agente, sem a necessidade do sequenciamento do genoma inteiro. Eltahir *et al.* (2011) estudando amostras chinesas provenientes de regiões distintas as agruparam em quatro grupos genômicos com alto *bootstrap*. No entanto Van Santen *et al.* (2001) estudaram e caracterizaram 14 isolados de CAV presentes em amostras clínicas obtidas de frangos de corte no Alabama (EUA). Os autores encontraram diferenças entre as sequências 2,8% e não observaram a formação de grupos genéticos quando analisadas filogeneticamente com 10 estirpes de outros países.

Todd *et al.* (2002) descreveram alterações de alguns aminoácidos (75, 89, 125, 141 e 144) na VP1 provocando atenuação das linhagens de CAV após múltiplas passagens do clone de Cux-1 do CAV em cultivos celulares. Estudo filogenético com CAVs brasileiros realizados por Simionatto *et al.* (2006), encontraram na região que codifica parcialmente a VP1 (539 pb) nucleotídeos diferentes em 42 posições, o que resultou em alteração de nove aminoácidos entre eles na posição 65 o resíduo R e na posição 98 o resíduo F ambos aminoácidos não descritos na literatura antes, não encontrando relações geográficas com 30 sequências de diferentes partes do mundo disponíveis no GenBank e concluíram que as sequências brasileiras possuem características filogenéticas similares as isoladas em outros países.

Yamaguchi *et al.* (2001) definiram como o maior determinante da virulência do CAV a posição 394 da proteína VP1, indicando que, se este resíduo nesta posição é uma Glutamina em vez de Histidina, as estirpes do CAV são mais patogênicas. Todd *et al.* (2003) observaram que clones atenuados por repetidas passagens (173) em cultivos

celulares tinham diferenças em sua virulência sendo esta revertida quando sofria pelo menos dez passagens em aves susceptíveis. Os mesmos autores, estudando a sequência da VP1, observaram que existia uma substituição da Alanina (A) por um Ácido Aspártico (D) no aminoácido 287, sugerindo que esta substituição é importante na reversão da virulência do vírus.

## 7. Patogenia

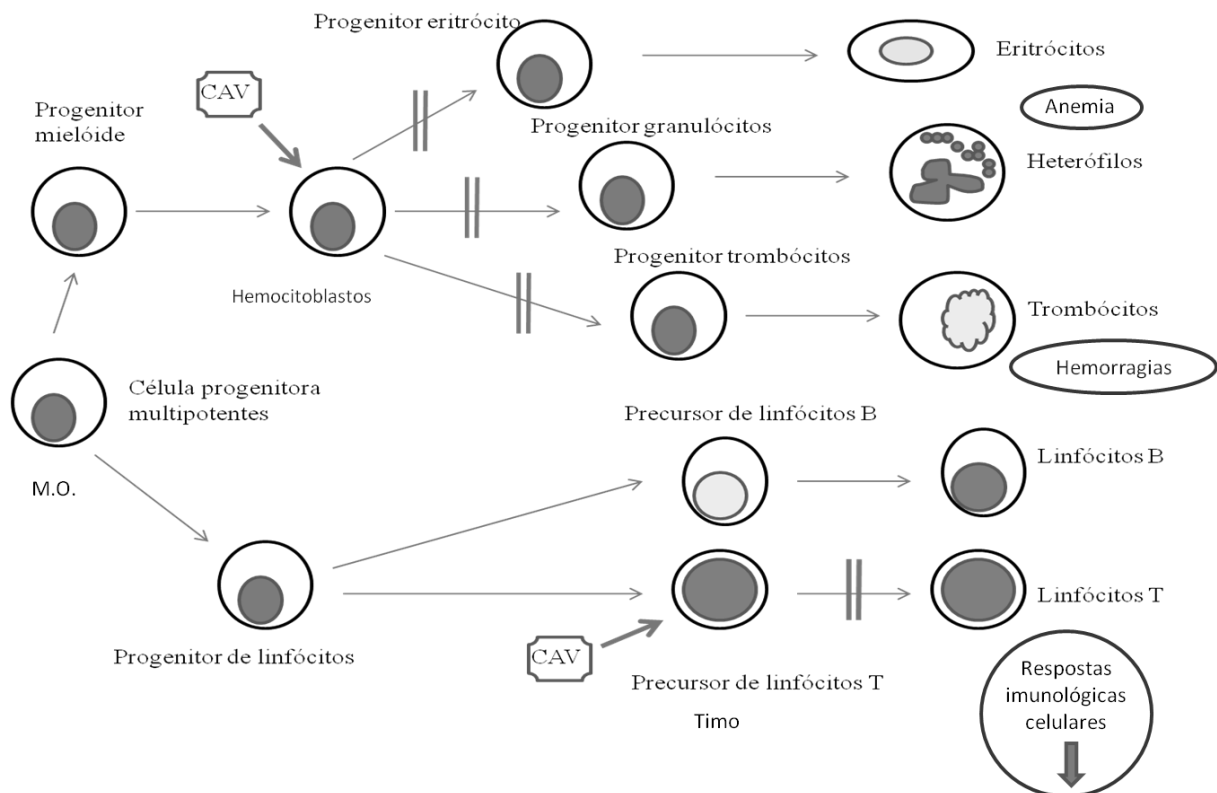
As lesões histológicas observadas nas aves infectadas naturalmente são no timo severa depleção, degeneração hidrópica redução dos centros germinativos, proliferação de células reticulares, decréscimo do número de linfócitos e focos necróticos (Brentano, 2009; Schat e Van Santen, 2008). Já na bolsa cloacal afetada são observados atrofia de folículos linfoides, focos necróticos, aumento de tecido interfolicular e células linfoides com núcleos picnóticos e vacúolos no citoplasma. Estas lesões podem ser confundidas com as provocadas pelo vírus da Doença Infecciosa Bursal (DIB), dependendo do estágio da infecção (Schat e Van Santen, 2008). Na medula óssea a aplasia e atrofia envolve todos os compartimentos e afetam todas as linhagens hematopoiéticas. Pequenos focos necróticos também podem ser observados. As células hematopoiéticas são substituídas por tecido gorduroso e proliferação do estroma celular por isso na observação da lesão macroscópica a medula aparece amarelada. No baço se observa depleção de linfócitos T com hiperplasia de células reticulares. No fígado, rins, pulmões, proventriculo duodeno e tonsilas cecais se observam depleção de focos linfoides. No fígado algumas vezes se observa aumento e dilatação dos sinusóides hepáticos. Pequenas inclusões eosinofílicas nucleares têm sido descritas em células infectadas predominantemente no timo e medula óssea e foram mais frequentes nos 5-7 dias após

inoculação experimental (Goryo *et al.*, 1989; Smyth *et al.*, 1993).

O vírus infecta as células da medula óssea, particularmente hemocitoblastos precursores de eritrócitos, trombócitos e leucócitos (Figura 2), além de infectar linfócitos T imaturos CD4+ e CD8+ e células T maduras no timo e baço (Adair, 2000; Tan e Tannock, 2005). A depleção dos linfócitos TCD4+ reduz a resposta imune celular e humoral da ave contra outros patógenos. Assim mesmo a apoptose das células T CD8+ causada pelo CAV diminui a capacidade da resposta celular mediada pelos linfócitos dificultando a eliminação dos patógenos intracelulares e facilitando a ocorrência de infecções crônicas (Brentano, 2009).

Os pintos infectados que apresentam anemia geralmente têm valores de hematócrito baixos, de 10 a 20% (normal: 27 a 35%), contagem de hemácias abaixo de  $1 \times 10^6 / \text{mm}^3$  (normal:  $2.76 \times 10^6 / \text{mm}^3$ ) e contagem de leucócitos abaixo de 5.000/mm<sup>3</sup> (normal: 30.000/mm<sup>3</sup>) (Yuasa *et al.*, 1979; Schat e Van Santen, 2008).

Na infecção clínica e subclínica do CAV, os macrófagos têm reduzida sua função de apresentação e processamento de antígenos, restringida fagocitose e sua ação bactericida fica alterada (McConnell *et al.*, 1993; Brentano, 2009). A expressão do receptor Fc nos macrófagos está alterada e também a produção de IL-1 (Interleucina 1) (McConnell *et al.*, 1993). Portanto, a infecção pelo CAV resulta na alteração da função das células do sistema imune, com consequente imunodepressão (Brentano, 2009).



**Figura 2.** Representação esquemática da patogênese do CAV, demonstrando, quais células do sistema imune são infectadas pelo vírus. Adaptado de Adair (2000).

## 8. Epidemiologia

As galinhas são o único hospedeiro natural reconhecido para o CAV, mas evidências sorológicas têm revelado a ocorrência desta infecção doença em outras aves domésticas como a codorna Japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) (Farkas *et al.*, 1998).

O CAV tem transmissão vertical, da progenitora ao embrião, via transovariana. Por sua vez, a transmissão horizontal é via fecal, oral ou aérea. Como já foi demonstrada por Rosenberger e Cloud (1989), a infecção é adquirida principalmente a partir do vírus excretado nas fezes em grandes quantidades (Hoop, 1992). O CAV pode ser eliminado pelas fezes por um período de até duas semanas, podendo se estender por um período maior,

dependendo da resposta humoral do hospedeiro. Quando ocorre o aparecimento dos anticorpos contra o vírus, a excreção fecal é interrompida (Yuasa *et al.*, 1983). Davidson *et al.* (2008) demonstraram a infecção de CAV pelas penas por métodos sorológicos, virais e patológicos, e afirmaram que as penas contribuem para a disseminação horizontal do vírus.

A presença de CAV tem sido relatada inclusive em aves SPF (Cardona *et al.*, 2000a; Schat e Schukken, 2010). A transmissão vertical do CAV em lotes destinados à produção de imunobiológicos pode ter garantido por muitos anos a disseminação do mesmo via iatrogênica por meio de vacinas contaminadas (Rosenberger e Cloud, 1989; Schat e Van Santen, 2008; Amer *et al.*, 2011). O vírus

também pode ser transmitido mecanicamente de granja para granja por meio de pessoas, equipamentos e veículos.

A presença de CAV nos órgãos reprodutivos das matrizes já foi descrito por vários autores, inclusive na presença de anticorpos neutralizantes, permanecendo nos tecidos reprodutivos em estado de latência (Cardona *et al.*, 2000a ; Brentano *et al.*, 2005), o que permite ao vírus replicar-se e disseminar-se na maturidade sexual (Schat e Schukken, 2010). Isso induz a persistência viral por várias gerações e explica sua alta prevalência ainda em presença de anticorpos neutralizantes. A replicação do vírus é regulada pela presença de estrógenos: quanto maior a concentração destes hormônios, maior a replicação do vírus (Miller *et al.*, 2005).

O CAV é altamente resistente às condições ambientais, à inativação química e ao calor. A eliminação do vírus na granja é difícil e cara, devido às altas concentrações necessárias de desinfetantes para uma efetiva inativação. O CAV é resistente à fumigação com formol por 24 horas, ao tratamento ácido (pH 3,0) por 3 horas e aos desinfetantes a base de glutaraldeído 1%, usados em larga escala em empresas avícolas. Desinfetantes com pH 2,0 são amplamente usados na produção de aves SPF e, aparentemente, são efetivos na inativação do vírus. No laboratório, temperatura superior a 70°C por 35 minutos, assim como altas concentrações de hipoclorito de sódio em estufa (37°C), podem ser utilizados para inativação do vírus (Rosenberger e Cloud, 1989; Brentano, 2009).

## 9. A doença no Brasil

Um levantamento sorológico no Brasil revelou 89% de positividade de anticorpos contra CAV utilizando testes de ELISA em soros de matrizes pesadas adultas, nos cinco

estados de maior produção (Brentano *et al.*, 2000). Em Minas Gerais, Gomes *et al.* (2005) demonstraram que 97,2% das matrizes pesadas da avicultura industrial apresentavam sorologia positiva para CAV (ELISA) a partir da 17ª semana de idade.

Barrios *et al.* (2009) determinaram a ocorrência do CAV na avicultura de subsistência da região metropolitana de Belo Horizonte (MG) destacando que no Brasil não se conhece a situação sanitária destas aves para este vírus. Usando um nested-PCR detectaram em diferentes tecidos o genoma de CAV em 30% das aves.

Barrios *et al.* (2012) detectaram o genoma de CAV em vacinas comerciais produzidas na década de 90 e pertencentes a diferentes laboratórios. Os autores cogitam um papel epidemiológico importante como fonte de infecção para CAV na atualidade.

## 10. Ocorrência do CAV em outras partes do mundo

Toro *et al.* (2006) fizeram um levantamento sorológico nos Estados Unidos em amostras de soros colhidas entre 1959 e 1975 e detectaram anticorpos na maior parte das amostras (entre 43% a 100%), sugerindo que a ocorrência do vírus é anterior ao seu primeiro isolamento em 1979 e que a ocorrência era alta. Oluwayelu e Todd (2008) detectaram parte do genoma de CAV em soros de galinhas de subsistência, confirmando a susceptibilidade destas frente ao vírus. Estes mesmos autores concluíram que a baixa produtividade e o pior índice de conversão alimentar das galinhas de subsistência na Nigéria em parte podem ser devido à infecção por este vírus. Segundo Oluwayelu (2010), o CAV pode passar da avicultura comercial para a de subsistência ou vice-versa. O autor também afirmou que as galinhas de subsistência contribuem para a

disseminação e persistência do vírus, além de ser um hospedeiro ideal para o aumento de sua variabilidade genética.

Elthair *et al.* (2011) observaram uma ocorrência de 10,22% na avicultura industrial na China em aves de 6 a 36 semanas de idade detectados pela PCR. Usando a Nested PCR Ducatez *et al.* (2008) detectaram em suabes cloacais de galinhas comercializadas em mercados de aves vivas em dois diferentes províncias chinesas 87% de positividade para CAV.

Na Argentina foram analisadas para a presença de CAV trinta e uma amostras de tecidos principalmente na província de Buenos Aires, sendo detectada pela PCR, de 18 amostras (58%); as aves positivas tinham mais de 3 semanas de idade e eram oriundas da avicultura industrial (Craig *et al.*, 2009).

## **11. Interação com outros agentes imunodepressores**

### **11.1 CAV e o vírus da doença de Marek**

Haridy *et al.* (2009) estudaram a co-infecção de CAV e o vírus da doença de Marek e observaram aumento na mortalidade induzida pela doença de Marek, redução significativa dos valores hematológicos e maior depleção de células TCD8+ no baço e timo. Os autores concluíram que a severa hipoplasia da medula óssea, anemia e redução do timo são devidas a co-infecção com CAV, já que no grupo somente inoculado com o vírus da doença de Marek a mortalidade era menor.

### **11.2 CAV e Reovirus**

A co-infecção de CAV e Reovírus foi descrita por McNeilly *et al.* (1995), os autores inocularam pela via oral ambos vírus e observaram diminuição significativa no ganho de peso, redução do hematócrito e as lesões nos tecidos após a necropsia foram mais marcadas quando comparados com os pintos inoculados com os vírus por separado (McNeilly *et al.*, 1995).

### **11.3 CAV e o Vírus da doença Infecçiosa Bursal (VDIB)**

O VDIB e o CAV atuam de forma sinérgica na produção de lesões e na imunodepressão, e as aves desenvolvem uma severa anemia (Toro *et al.*, 2009). Rosenberger e Cloud (1989) mostraram que quando se inoculava o VDIB em aves SPF no primeiro dia de idade, aumentava o período de susceptibilidade à anemia produzida pelo CAV. A mortalidade e a anemia foram maiores nos lotes infectados previamente pelo vírus da DIB. O número de macrófagos e células T do baço e timo estavam diminuídos na co-infecção.

## **12. Diagnóstico**

O diagnóstico da infecção pelo CAV é rotineiramente feito por meio da detecção de anticorpos específicos ou pelo isolamento do vírus. A detecção de anticorpos pode ser feita por meio de testes de Imunoperoxidase Indireta (IPI), ELISA, Imunofluorescência Indireta (IFI), ou Vírus Neutralização (VN) (Cardona *et al.*, 2000b). A IPI e o ELISA para detecção de anticorpos foram desenvolvidos por Lamichhane *et al.* (1992). O IFI e o IPI têm como desvantagens requererem equipamento específica para sua leitura,

além de um observador treinado. A VN tem como desvantagem a necessidade da contínua passagem do vírus em cultivo celular. Além disso, a dificuldade na interpretação dos resultados torna alguns destes testes muito trabalhosos para serem utilizados em estudos mais amplos (Lamichhane *et al.*, 1992). O ELISA tem sido muito utilizado na investigação da soroprevalência do vírus nos plantéis avícolas (Brentano *et al.*, 2000) e tem como desvantagem não detectar anticorpos quando a infecção é recente.

O isolamento do vírus pode ser feito em pintinhos SPF. As aves podem ser inoculadas por via intramuscular ou intraperitoneal, no primeiro dia de vida, sendo que o aparecimento das lesões macroscópicas é mais pronunciado após o 12<sup>o</sup> de inoculação. A confirmação do diagnóstico é feita por meio das lesões macroscópicas de atrofia de órgãos linfóides, especialmente timo, e palidez da medula óssea, com presença de hemorragias subcutâneas ou musculares e baixos níveis de hematócrito (menor que 27%) (Schat e Van Santen, 2008; Brentano 2009).

O isolamento do vírus também pode ser feito em cultivos celulares de algumas linhagens de células originárias de linfomas aviários, derivadas de tumores esplênicos da doença de Marek (MDCC-MSB-1) (Yuasa *et al.*, 1983). O isolamento *in vitro* tem como desvantagem o fato do CAV não replicar em culturas celulares de tecidos de aves, nem em linhagens de células de mamíferos, comumente utilizadas. O isolamento em ovos embrionados tem como desvantagem para o diagnóstico o fato de não ocorrer efeito letal sobre os embriões (Yuasa *et al.*, 1979).

O isolamento do vírus é trabalhoso, requer várias passagens nos cultivos celulares e consome muito tempo, além de muitas estirpes do CAV não se adaptarem bem ao

cultivo celular e algumas delas não terem efeito citopático, o que poderia resultar em falsos negativos (Nogueira *et al.*, 2005; Chacón *et al.*, 2010). Devido a estes fatores, testes moleculares foram desenvolvidos por vários autores (Noteborn *et al.*, 1992; Todd *et al.*, 1992; Soiné *et al.*, 1993; Amer *et al.*, 2011), os quais avaliaram a PCR como uma técnica sensível de detecção do CAV, quando comparada com testes como o isolamento viral e testes de imunofluorescência ou hibridização em “dot-blot” (Soiné *et al.*, 1993). A técnica da PCR possui uma significativa vantagem sobre o cultivo *in vitro*, pois as técnicas de amplificação de ácidos nucleicos não são limitadas pela capacidade do vírus crescer em culturas celulares (Todd *et al.*, 1992). Todd *et al.* (1992) desenharam oligonucleotídeos que amplificam parcialmente (675pb) a proteína VP1 do CAV na sua região N-terminal. A PCR se mostrou eficiente ainda para amplificar DNA de tecidos fixados em formol (Imai *et al.*, 1998).

A “nested-PCR” tem sido descrita por vários autores para amplificação do CAV (Cardona *et al.*, 2000; Sóine *et al.*, 1993; Simionatto *et al.*, 2006) mostrando ser uma técnica muito sensível e útil para pesquisa do CAV em aves com a doença subclínica e a pesquisa do genoma nas gônadas de matrizes. A nested PCR aumenta tanto a sensibilidade como a especificidade da PCR tradicional, na nested-PCR se procede uma segunda amplificação, utilizando como molde o produto da amplificação anterior e um par de primers, que se situe em posição interna na sequência do DNA. Esta técnica tem como desvantagem o alto risco de contaminação cruzada (Sóine *et al.*, 1993).

A PCR em tempo real também tem sido usada para quantificar o DNA ou RNA de CAV presente nos tecidos (Markowski-Grimsrud *et al.*, 2002). Noteborn *et al.* (1992) compararam o genoma de vários

CAVs isolados, amplificados e clonados usando as enzimas de restrição (EcoR I, Acc I, Bgl II, Hind III, Sst I, BamHI, Xba I) e observaram que alguns isolados de campo não continham um local Acc I (posição 356) ou Hind III (posição 791), e apenas uma minoria apresentava um sítio EcoRI.

### 13. Controle

O controle do CAV em matrizes é feito por meio de rigorosas medidas de biossegurança e vacinação. Para a prevenção do CAV tem sido realizada a vacinação das matrizes entre a 16ª e a 18ª semana de vida, utilizando uma vacina viva atenuada (Brentano, 2009). No Brasil há três tipos de vacinas vivas comerciais disponíveis para o controle do CAV: a TAD Thymo vac® (Lohman, Animal Health), a Nobilis CAV P4® (Intervet), e a Circomune W® (estirpe Del-Ros) da CEVA Saúde Animal Ltda (Avisite, 2010).

É recomendado que as aves soroconvertam antes do início da idade de postura para a adequada transferência de anticorpos para a prole. Entretanto, um estudo realizado por Brentano *et al.* (2005) indica que a imunidade mediada por anticorpos não previne a transmissão vertical do vírus, já que foi confirmada a presença do CAV nos tecidos reprodutivos de matrizes pesadas com 55 e 59 semanas de vida, que tinham sido imunizadas previamente com o CAV. DNA do CAV foi detectado nos embriões dessas matrizes.

O controle do CAV também inclui a prevenção de outros agentes imunodepressores, uma vez que a co-infecção aumenta a severidade da doença (Toro *et al.*, 2009; Chacón *et al.*, 2010).

O CAV é resistente à maioria dos desinfetantes usados na avicultura, o que

permite que o vírus permaneça por longos períodos no ambiente. Ressalta-se que a reutilização de cama de aviário é uma prática que vem aumentando nos últimos anos em lotes de frangos de corte. Porém, essa prática oferece riscos quando a cama não é manejada e desinfetada adequadamente, já que o vírus não será eliminado do ambiente. A eliminação da matéria orgânica das instalações e equipamentos, seguida da utilização de desinfetante em altas concentrações, como hipoclorito de sódio a 10% e o uso de vassoura de fogo, podem reduzir a carga infectante do vírus (Brentano, 2009).

### 14. Referências Bibliográficas

AMER, H. M.; ELZAHED, H. M.; ELABIARE, E. A. *et al.* An optimized polymerase chain reaction assay to identify avian virus vaccine contamination with Chicken anemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.23, n. 1, p. 34-40, 2011

ADAIR, B. M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 24, n. 2-3, p. 247–255, 2000.

AVISITE, 2010. Revista eletrônica. Disponível em: <[http://www.avisite.com.br/revista/pdfs/revista\\_edicao41.pdf](http://www.avisite.com.br/revista/pdfs/revista_edicao41.pdf)> Acesso em: 10 jul. 2011. n. 41, p. 65, 2010.

BARRIOS, P. R.; MARIN, S. Y. G.; RIOS, R. L. *et al.* A Retrospective PCR Investigation of Avian Orthoreovirus, Chicken Infectious Anemia and Fowl Aviadnavirus Genomes contamination in Commercial Poultry Vaccines in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.64, n.1, p. 231-235, 2012.

BARRIOS, P. R.; MARÍN, S. Y.; RESENDE, M. *et al.* Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte,

- Minas Gerais. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.11, n.2, p.135-138, 2009a.
- BARRIOS, P. R. *Deteção do vírus da anemia infecciosa das galinhas em Minas Gerais*. 2009. 58f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- BRENTANO, L. Anemia infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J. *et al.* (Eds). *Doenças de aves*. 2. ed. Campinas: FACTA - Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009. p. 735-762.
- BRENTANO, L.; LAZZARIN, S.; BASSI, S. S. *et al.* Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. *Vet. Microbiol.* v.105, n. 1, p. 65-72, 2005.
- BRENTANO, L.; SILVA, B. G.; SAYD, S. *et al.* Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte do Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 2, n.2, p. 157-179, 2000.
- BRENTANO, L.; MORES, N.; WENTZ, I. *et al.* Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Dis.*, v. 35, p. 793–800, 1991.
- BROWN, H. K.; BROWNING, G. F.; SCOTT, P. C. *et al.* Full-length infectious clone of a pathogenic Australian isolate of chicken anemia virus. *Aust. Vet. J.*, v.78, n.9, p.637–640, 2000.
- CANAL, C. W.; FERREIRA, D. J.; MACAGNAN, M. *et al.* Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in Southern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 24, n.2, p. 89-92, 2004.
- CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A. Distribution of chicken anemia virus in the reproductive tissues of specific pathogen free chickens. *J. Gen. Virol.*, v.81, n. 9, p. 2067–2075, 2000a.
- CARDONA, C.; LUCIO, B.; O'CONNELL, P. *et al.* Humoral immune responses to chicken infectious anemia virus in three strains of chickens in a closed flock. *Avian Dis.*, v.44, n. 3, p. 661-667, 2000b.
- CHACÓN, J. L.; NOGUEIRA, E. O.; RENTANO, L. *et al.* Detection of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus co-infection in broilers. *Braz. J. Vet. Res. An. Sci.*, v. 47, n. 4, p. 293-297, 2010.
- CHOWDHURY, S. M. Z. H.; OMAR, A. R.; AINI, I. *et al.* Pathogenicity, sequence and phylogenetic analysis of Malaysian Chicken anaemia virus obtained after low and high passages in MSB-1 cells. *Arch. Virol.*, v. 148, n. 12, p. 2437–2448, 2003.
- CRAIG M. I.; RIMONDI, A.; DELAMER, M. *et al.* Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007. *Avian Dis.*, v.53, n.3, p. 331-335, 2009.
- CROWTHER, R. A.; BERRIMAN, J. A.; CURRAN, W. L. *et al.* Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J. Virol.*, v. 77, n. 24, p. 13036-13041, 2003.
- DAVIDSON, I.; ARTZI, N.; SHKODA, I. *et al.* The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. *Virus Res.*, v.132, n. 1-2, p. 152-159, 2008.
- DUCATEZ, M. F.; CHEN, H.; GUAN, Y. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus (CAV) in southeastern chinese



live birds markets. *Avian Dis.*, v. 52, n.1, p. 68-73, 2008.

DUCATEZ M. F.; OWOADE A. A.; ABIOLA J. O. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch. Virol.*, v.151, n.1, p. 97-111, 2006.

ELTAHIR Y.M.; QIAN, K.; JIN, W. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. *Virol. J.*, v. 8, n.145, p. 1-8, 2011. Disponível em:<  
<http://www.virologyj.com/content/pdf/1743-422X-8-145.pdf>> Acessado em: 05/12/2011.

FARKAS, T.; MAEDA, K.; SUGIURA, H. *et al.* A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anemia virus (CAV) in Japan. *Avian Pathol.*, v.27, n. 3, p. 316–320, 1998.

GORYO, M., T.; SUWA, T.; UMEMURA, C. *et al.* Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol.*, v. 18, n. 1, p. 73-89, 1989.

GOMES, F. R.; LOBATO, Z. I. P.; OLIVEIRA, D. D. *et al.* Chicken anemia virus: serology in broiler breeders and virus detection in the progeny. *Anais do 16º Encontro Nacional de Virologia*. Campos do Jordão, São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia (SBV), 2005, p. 22-25.

HARIDY, M.; GORYO, M.; SASAKI, J. *et al.* Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anemia virus. *Avian Pathol.*, v.38, n.6, p. 469-483, 2009.

HE, C. Q; DING, N. Z.; FAN, W. *et al.* Identification of chicken anemia virus

putative intergenotype recombinants. *Virol.*, v. 366, n.1 p. 1-7, 2007.

HOOP, R. K. Transmission of chicken anaemia virus with semen. *Vet. Rec.*, v.133, n. 22, p. 551-552, 1993.

HOOP, R. K. Persistence and vertical transmission of chicken anemia agent in experimentally infected laying hens. *Avian Pathol.*, v.21, n.3, p. 493-501, 1992.

IMAI, K.; MASE, M.; TSUKAMOTO, K.; *et al.* Persistent infection with chicken anaemia virus and some effects of highly virulent infectious bursal disease virus infection on its persistency. *Res. Vet. Sci.*, n. 67, p. 233–238, 1999.

IMAI, K.; MASE, M.; YAMAGUCHI, N. *et al.* Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, v. 64, n. 3, p. 205-208, 1998.

ISLAM, M. R.; JOHNE, R.; RAUE, R. *et al.* Sequence analysis of the full-length cloned DNA of chicken anaemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence of genetic grouping of CAV strains based on the deduced VP1 amino acid differences. *J. Vet. Med. B.*, v.49, n.7, p. 332-337, 2002.

KAFFASHI, A.; NOORMOHAMMADI, A. H.; ALLOTT, M.L. *et al.* Viral load in 1-day-old and 6-week-old chickens infected with chicken anaemia virus by the intraocular route. *Avian Pathol.*, v. 35, n.6, p. 471-474, 2006.

LAMICHHANE, C. M.; SNYDER, D. B.; GIRSCHICK, T. *et al.* Development and comparison of serologic methods for diagnosing chicken anemia virus infection. *Avian Dis.*, v.36, n.3, p. 725–729, 1992.

MARKOWSKI-GRIMSRUD, C. J.; MILLER, M. M.; SCHAT, K. A.

- Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus. *J. Virol. Methods*, v. 101, n. 1-2, p. 135-147, 2002.
- MCNEILLY, F.; SMYTH, J. A.; ADAIR, B. M. *et al.* Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian Reovirus following dual infection of 1- day-old chicks by a natural route. *Avian Dis.*, v.39, n.3, p. 532-537, 1995.
- MCNULTY, M. S.; CONNOR, T. J., MCNEILLY, F. *et al.* Chicken anemia agent in the United States: isolation of the virus and detection of antibody in broiler breeder flocks. *Avian Dis.*, n. 33, p. 691-694, 1989.
- MCNULTY, M.S.; MCILROY, S.G.; BRUCE, D.W. *et al.* Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 35, n.2, p. 263-268, 1991.
- MCNULTY, M.S.; MACKIE, D.P.; POLLOCK, D.A. *et al.* Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies to chicken anemia agent. *Avian Dis.*, v. 34, n.2, p. 352-358, 1990.
- MEEHAN, B.M.; TODD, D.; CREELAN, J.L. *et al.* Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch. Virol.*, v.124, n.2-3, p. 301-319, 1992.
- MILES, A.M.; REDDY, S.M.; MORGAN, R.W. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. *Avian Dis.*, v.45, n.1, p. 9-18, 2001.
- MILLER, M. M; JAROSINSKI, K.W; SCHAT, K.A. Positive and negative regulation of chicken anemia virus transcription. *J. Virol.*, v.79, n.5, p. 2859 - 2868, 2005.
- MIYAKI, C. Y.; RUSSO, C. M.; PEREIRA, S. L. Reconstrução filogenética. Introdução e o método da máxima parcimônia. In: MATIOLI, S.R. (Ed.) *Biologia molecular e evolução*. São Paulo: Holos Editora, 2001. p. 97-107.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C. *et al.* Circoviridae. *Veterinary Virology*. 3. Ed. San Diego, California: Academic Press Editora, 1999. p.357-362.
- NOGUEIRA, E. O.; FERREIRA, A. J. P; SOARES, R. M. *et al.* Genome sequencing analysis of Brazilian chicken anemia virus isolates that lack MSB-1 cell culture tropism. *Comp. Immunol. Microb.*, v. 30, n.2, p. 81-96, 2007.
- NOGUEIRA, E. O.; BRENTANO, L.; FERREIRA, A. J. P. A VP3/VP1 gene polymerase chain reaction assay for detection of chicken anemia virus in broiler samples. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n.2, p. 131-140, 2005.
- NOTEBORN, M. H. M. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms. *Vet. Microbiol.*, v.98, n.2, p.89-94, 2004.
- NOTEBORN, M. H. M.; OORSCHOT, A. A. M. D.; VAN DER, E. B. A. Chicken anemia virus: Induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus. *Sem. Virol.*, v.8, n. 6, p. 497-504, 1998.
- NOTEBORN, M. H. M.; KRANENBURG, O.; ZANTEMA, A. *et al.* Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. *Gene*, v.118, n.2, p. 267 - 271, 1992.

- OLUWAYELU, D. O. Diagnosis and epidemiology of chicken infectious anemia in Africa. *Afr. J. Biotechnol.*, v 9, n.14, p. 2043-2049, 2010.
- OLUWAYELU, D. O.; TODD, D. Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis. *Afr. J. Biotechnol.*, v.7, n.3, p. 271-275, 2008.
- OLUWAYELU, D. O.; TODD, D.; OLALEYE, O. D. Sequence and phylogenetic analysis of chicken anemia virus obtained from backyard and commercial chickens in Nigeria. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.75, n.4, p.353-357, 2008.
- PETERS, M. A.; CRABB, B. S.; WASHINGTON, E. A. *et al.* Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. *J. Gen. Virol.*, v. 87, n.4, p. 823-831, 2006.
- PRINGLE, C. R. Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Arch. Virol.*, n.144, p. 2065-2070, 1999.
- RENSHAW R.W.; SOINÉ C.; WEINKLE T. *et al.* A hypervariable region in VP1 of chicken anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J. Virol.*, v.70, n.12, p.8872-8878, 1996.
- ROSENBERGER, J. K.; CLOUD, S. S. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Dis.*, n. 33, p. 707-713, 1989.
- SCHAT, K.A.; SCHUKKEN, Y.H. A longitudinal survey for the presence of antibodies to chicken infectious anemia virus in two specific-pathogen-free strains of chickens. *Avian Dis.*, v.54, n.1, p. 46-52, 2010.
- SCHAT, K. A.; VAN SANTEN, V. Chicken anemia virus. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R. *et al.* (Eds.), *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University, 12 ed. 2008. p. 211-235
- SCHAT, K. A. Patogenia do vírus da anemia infecciosa das galinhas, a relação hospedeiro-vírus definitiva. In: CONFERENCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2004, Santos, SP. *Anais Conferencia FACTA*. Campinas: FACTA, 2004. p 183-190.
- SCOTT, A. N. J.; CONNOR, T. J.; CREELAN, J. L. *et al.* Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anaemia virus isolates obtained after multiple cell culture passages. *Arch. Virol.*, v. 144, n.10, p. 1961-1975, 1999.
- SIMIONATTO, S.; LIMA-ROSA, C. A.; BINNECK, E. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anaemia virus. *Virus Genes*, v. 33, n.1, p. 5-10, 2006.
- SMYTH, J. A.; MOFFETT, D. A.; MCNULTY, M. S. *et al.* A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Dis.* v.37, n.2, p. 324-338, 1993.
- SMYTH J. A.; MOFFETT D. A.; CONNOR T. J. *et al.* Chicken Anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3-week-old and 6-week-old chickens. *Avian Pathol.*, v. 35, n.3, p. 254 - 259, 2006.
- SOINÉ, C.; WATSON, S. K.; RYBICKI, E. *et al.* Determination of the detection limit of

- the polymerase chain reaction for chicken infectious anemia virus. *Avian Dis.*, v.37, n. 2, p. 467–476, 1993.
- SOMMER F.; CARDONA C. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. *Avian Dis.*, v.47, n.4, p. 1466-1473, 2003.
- SPACKMAN, E.; CLOUD S. S.; POPE, C. R. *et al.* Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate. I. Pathogenesis. *Avian Dis.*, n. 46, p. 945-955, 2002.
- TAN, J.; TANNOCK, G. A. Role of viral load in the pathogenesis of chicken anemia virus. *J. Gen. Virol.*, v. 86, n. 5, p. 1327-1333, 2005.
- THAM, K. M.; STANISLAWEK, W. L. Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus-DNA in tissues and sera. *Avian Dis.*, v. 36, n.4, p. 1000-1006, 1992.
- TODD, D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet. Microbiol.*, v.98, n.2, p.169–174, 2004.
- TODD, D; CREELAN, J. L.; CONNOR, T. *et al.* Investigation of the unstable attenuation exhibited by a chicken anaemia virus isolate. *Avian Pathol.*, v. 32, n.4, p.375-382, 2003.
- TODD, D.; SCOTT, A. N. J.; BALL, N. W.; *et al.* Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates. *J. Virol.*, v. 76, n. 16, p. 8472-8474, 2002.
- TODD, D.; MAWHINNEY, K. A.; MCNULTY, M. S. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, n.30, p. 1661-1666, 1992.
- TORO, H.; RAMIREZ, A. M. LARENAS, J. Pathogenicity of chicken anaemia virus (isolate 10343) for young and older chickens. *Avian Pathol.*, v.26, n.3, p.485-499, 1997.
- TORO, H.; EWALD, S.; HOERR, F.J. Serological evidence of chicken infectious anemia virus in the united states at least since 1959. *Avian Dis.*, v. 50, n. 1, p. 124–126, 2006.
- TORO, H.; VAN SANTEN, V.I.; HOERR, F.J. *et al.* Effects of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus in comercial chickens. *Avian Dis.*, v. 53, n. 1, p. 94-102, 2009.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). Avicultura Brasileira em 2010: Estatística. Disponível online [www.ubabef.com.br/](http://www.ubabef.com.br/) (Acesso, 28 de fevereiro de 2011).
- VAN SANTEN, V. L.; LI, L.; HOERR, F. J. *et al.* Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama. *Avian Dis.*, v. 45, n. 2, p. 373–388, 2001.
- VIRUS TAXONOMY. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: [www.ictvonline.org.](http://www.ictvonline.org/) (Acessado em:18/10/2011)
- WANG, D.; FAN, W.; HAN, G. Z. *et al.* The selection pressure analysis of chicken anemia virus structural protein gene VP1. *Virus Genes.* v.38 n.2, p. 259-62, 2009.
- WANG, Q.M.; FAN, G.C.; CHEN, J.Z. *et al.* A putative NES mediates cytoplasmic localization of Apoptin in normal cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (Shanghai). v.36, n.12 p.817-23, 2004.

VON BÜLOW, V. Avian infectious anaemia and related syndromes caused by chicken anaemia virus. *Crit. Rev. Poultry Biol.*, v. 3, n. 2, p. 1-17, 1991.

VON BULOW, V.; SCHAT, K. A. Chicken infectious anemia. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, W. B. (Eds). *Diseases of Poultry*. Chapter 30. Iowa State University Press; Ames, IA. p.739-756, 1997.

YAMAGUCHI, S.; IMADA, T.; KAJI, N.; MASE, M. *et al.* Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, n. 82 p. 1233–1238, 2001.

YUASA, N.; IMAI, K. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* v.15, n. 1, p.639-645, 1986.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; GODA, M. *et al.* Isolation of chicken anemia agent with MDCC-MSB1 cells from chickens in the field. *Natl. I. Anim. Health Q.*, v. 23, n.3, p. 75-77, 1983.

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; YOSHIDA, I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.*, v. 23, n.2, p. 366-385, 1979.

## CAPITULO II - OBJETIVOS

### 1. Objetivo Geral

- Determinar a ocorrência, a diversidade genética e a relação filogenética de CAV detectado em aves provenientes de Minas Gerais e em vacinas aviárias comerciais.

### 2. Objetivos Específicos

- Desenhar e avaliar oligonucleotídeos específicos para região do gene que codifica a proteína estrutural VP1.
- Padronizar e avaliar a eficácia de uma semi-nested PCR com oligonucleotídeos específicos para parte da região codificadora da proteína VP1, para detectar o CAV em amostras clínicas obtidas de

lotes de aves comerciais (frangos de corte e poedeiras), subsistência e outras espécies de aves domésticas.

- Caracterizar geneticamente através do sequenciamento as estirpes provenientes de Minas Gerais e analisar para variações genéticas.
- Investigar o genoma do CAV em 40 vacinas comerciais de diferentes anos de produção (1991-2008).
- Comparar e analisar as similaridades nucleotídicas e dos aminoácidos inferidos, existentes entre as sequências deste estudo, com as sequências disponibilizadas no GenBank.
- Classificar as estirpes de acordo com os agrupamentos encontrados na análise filogenética.

## CAPITULO III- MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Laboratórios

O projeto foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Setor de Doenças das Aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os sequenciamentos dos produtos da PCR foram realizados no Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

### 2. Amostras Clínicas

- Foram testados amostras de tecidos de 74 granjas, 54 delas de frangos de corte e 20 de poedeiras comerciais, em diferentes localidades do estado de Minas Gerais, obtidas entre 2006 e 2011 (Quadro 1).
- Foram testadas 74 galinhas provenientes de avicultura familiar de diferentes propriedades, muitas das quais chegaram para diagnóstico de diferentes doenças ao Laboratório de Doenças das Aves da escola de veterinária da UFMG entre o ano de 2006 e 2011 (Quadro 1).
- Os materiais e órgãos de eleição foram: timo, baço, fígado, bolsa cloacal.
- Foram utilizadas 38 vacinas comerciais atenuadas e duas inativadas contra diferentes enfermidades e de diferentes empresas codificados de A - H, para a detecção do DNA de CAV (Quadro 2).
  - Foram testadas amostras de nove plantéis diferentes de codornas, oito plantéis de patos, quatro plantéis de

avestruzes, catorze origens diferentes de pombos, 58 aves silvestres, de aves que chegaram de diferentes origens para diagnóstico de diferentes doenças no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG (Quadro 3) entre 2006 e 2011.

### 3. Comitê de ética

O presente estudo foi previamente apresentado e realizado após a aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (Cetea). Sendo identificado pelo protocolo Nº175/2009.

**Quadro 1.** Numero de propriedades avaliadas para detecção do CAV na Avicultura industrial e familiar e sua distribuição por Mesorregiões.

<b>Nome da Mesorregião</b>	<b>Avicultura Familiar</b>	<b>Avicultura Industrial</b>
Noroeste de Minas	3	0
Norte de Minas	2	5
Jequitinhonha	1	0
Vale do Mucuri	0	0
Triângulo Mineiro / Alto Paranaíba	3	6
Central Mineira	4	5
Metropolitana de Belo Horizonte	34	31
Vale do Rio Doce	4	0
Oeste de Minas	2	3
Sul / Sudoeste de Minas	3	6
Campo das Vertentes	6	4
Zona da Mata	12	14
<b>Total</b>	<b>74</b>	<b>74</b>

\* O numero de aves avaliadas nas propriedades da avicultura familiar foi ummínimo de duas aves por propriedade; na avicultura industrial foram avaliadas de 3 a 5 aves por lote nas diferentes propriedades.



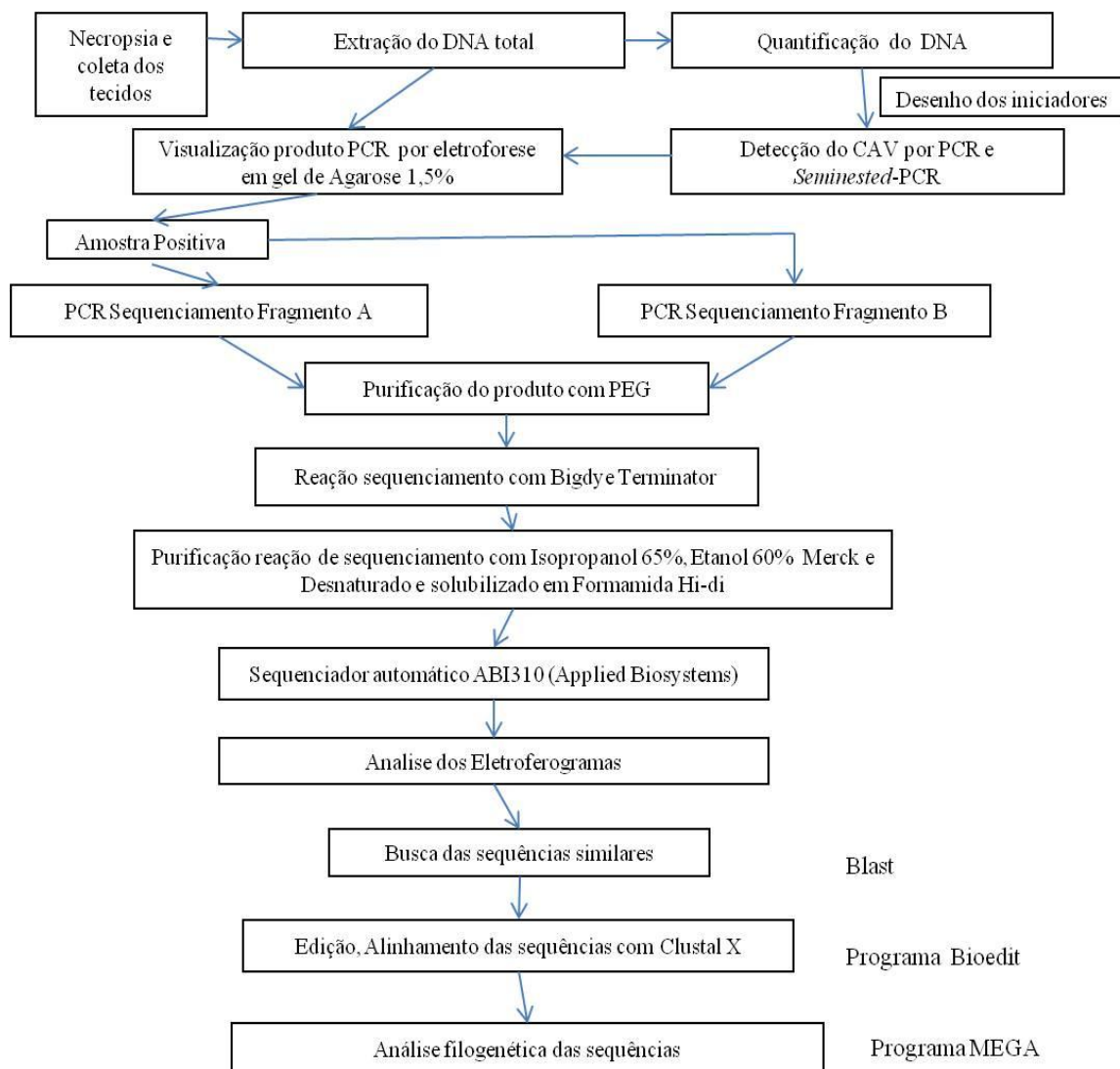
**Quadro 2.** Vacinas aviárias comerciais de vírus vivo atenuado e inativadas utilizadas no presente estudo para detecção de parte do genoma do CAV (VP1).

No.	Data de Fabricação	Vacina (Enfermidade)	Estirpe vacinal	Laboratório	Sistema de produção
1	jan/91	Newcastle (NC)	La sota B1	A	Ovos embrionados SPF
2	set/91	Bouba	Poxvírus de Galinha, amostra forte	A	Ovos embrionados SPF
3	dez/91	Bronquite	Massachusetts H-52	B	Ovos embrionados SPF
4	mar/92	Newcastle	La Sota B1	A	Ovos embrionados SPF
5	mai/92	Newcastle	La Sota B1	A	Ovos embrionados SPF
6	dez/92	Bronquite	Massachusetts H-52	C	Ovos embrionados SPF
7	jan/94	Encefalomielite	Calnek 1010	A	Ovos embrionados SPF
8	jan/95	Bronquite	Massachusetts H-52	D	Ovos embrionados SPF
9	jan/95	Bouba	Poxvírus de Galinha, amostra forte	A	Ovos embrionados SPF
10	fev/96	Marek	HVT-FC 126	C	Cultura primária de fibroblastos de embrião SPF
11	jul/96	Marek	HVT-FC 126	B	Cultura primária de fibroblastos de embrião SPF
12	set/97	Bronquites	Massachusetts H-120	C	Ovos embrionados SPF
13	jan/98	Newcastle	La Sota B1	C	Ovos embrionados SPF
14	set/98	Bronquite	Massachusetts H-90	C	Ovos embrionados SPF
15	nov/98	Doença infecciosa bursal	S-706	C	Cultura primária de fibroblastos de embrião SPF
16	dez/98	Doença infecciosa bursal	Estirpe Lukert (intermediária)	C	Ovos embrionados SPF
17	dez/98	Bronquite	Massachusetts H-120	C	Ovos embrionados SPF
18	set/01	Bronquite	Massachusetts H-90	E	Ovos embrionados SPF
19	Set/01	Bronquite	Massachusetts MA5	C	Ovos embrionados SPF
20	fev/02	Bronquite	Massachusetts H-120	F	Ovos embrionados SPF
21	abr/04	Doença infecciosa bursal	Lukert (amostra intermediária)	C	Ovos embrionados SPF
22	mai/04	*EDS-76	Inativada	B	Ovos embrionados de marreco
23	jun/04	Newcastle	La Sota B1	B	Ovos embrionados SPF
24	jul/04	Doença infecciosa bursal	Amostra intermediária GBV-8	B	Ovos embrionados SPF
25	jul/04	Newcastle	La Sota	B	Ovos embrionados SPF
26	ago/04	Bronquite	Massachusetts H-120	B	Ovos embrionados SPF
27	nov/04	Newcastle	La Sota B1	F	Ovos embrionados SPF
28	mar/05	Bronquite	Cepa Massachusetts H-120	F	Ovos embrionados SPF
29	mai/05	Encefalomielite	Calnek 1010	B	Ovos embrionados SPF
30	mai/05	Bronquite	Cepa Massachusetts H-120	F	Ovos embrionados SPF
31	jun/05	Newcastle	La Sota B1	G	Ovos embrionados SPF
32	ago/05	Newcastle	La Sota B1	F	Ovos embrionados SPF
33	ago/05	Bouba e Encefalomielite	Poxvírus de galinha, amostra forte e a estirpe Calnek 67	H	Ovos embrionados SPF
34	set/05	*BIG, NC, EDS-7, Coriza	Cepa 22L e H18	F	----
35	jan/06	Encefalomielite	Calnek 1010	H	Ovos embrionados SPF
36	mar/06	Encefalomielite	Calnek 1010	H	Ovos embrionados SPF
37	mai/06	Bronquite	Cepa Massachusetts H-120	H	Ovos embrionados SPF
38	abr/06	Bouba aviária	Amostra suave tipo galinha	H	Ovos embrionados SPF
39	out/06	Marek	Herpesvirus de peru (HVT), Sorotipo 3, cepa FC-126, e HVT sorotipo 1, cepa Rispens	H	Cultivos celulares de fibroblastos de embrião SPF
40	set/08	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	MG-70	B	Meio de cultura sintético

**Legenda** \*vacinas oleosas inativadas.

**Quadro 3.** Amostras clínicas obtidas de diferentes espécies de aves silvestres avaliadas para detecção de parte do genoma de CAV.

<b>Nome comum</b>	<b>Nome científico</b>	<b>No. de aves testadas</b>	<b>Tecido examinados para PCR</b>
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	16	Baço, fígado, timo
Maritaca	<i>Aratinga leucophthalma</i>	1	Baço, timo
Marianinha	<i>Pionites leucogaster</i>	5	Baço, timo
Arara Azul grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	1	Baço, timo
Arara Canindé	<i>Ara ararauna</i>	1	Baço, timo
Ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	1	Baço, timo
Maitaca verde	<i>Pionus maximiliani</i>	1	Baço, timo
Curica	<i>Amazona amazônica</i>	1	Baço, timo
Ecletus	<i>Ecletus roratus</i>	1	Baço, timo
Periquito tuim	<i>Forpus crassirostris</i>	1	Baço, timo
Tiriba de orelha branca	<i>Pyrrhura leucotis</i>	1	Baço, timo
Cuiú-cuiú	<i>Pionopsitta pileata</i>	1	Baço, timo
Canário da terra	<i>Sicalis flaveola</i>	1	Baço, timo
Pardal	<i>Passer domesticus</i>	2	Baço, timo
Canário	<i>Serinus canária</i>	5	Baço, timo
Rolinha	<i>Columbina talpacoti</i>	1	Baço, timo
Cardeal amarelo	<i>Gubernatrix cristata</i>	3	Baço, timo
Trinca-ferro-verdadeiro	<i>Saltador similis</i>	1	Baço, timo
Irele	<i>Dendrocygna viduata</i>	1	Baço, timo
Cisne-mudo	<i>Cygnus olor</i>	1	Baço, timo
Garça	<i>Ardea alba</i>	1	Baço, timo
Faisão-eperonier	<i>Polyplectron bicalcaratum</i>	1	Baço, timo
Faisão comum	<i>Phasianus colchicus</i>	3	Baço, timo
Coruja da igreja	<i>Tyto alba</i>	1	Baço, timo
Ema	<i>Rhea americana</i>	1	Baço, timo
Jacu	<i>Penelope obscura obscura</i>	1	Baço, timo



**Figura 1.** Fluxograma das etapas executadas durante o desenvolvimento desta tese.

#### 4. Extração do DNA

A extração do DNA dos tecidos foi feita pelo método de sílica e iodeto de sódio, seguindo o protocolo de Boom *et al.* (1990) modificado. A extração foi realizada por meio da reação do material bruto previamente macerado (200 µL), com aproximadamente 600 µL de iodeto de sódio (NaI) a 6M, sob aquecimento a 55° C e forte homogeneização em vórtex a cada cinco minutos, durante 15min. O material obtido foi submetido à centrifugação por três minutos a 3000 g e a parte líquida foi coletada com o auxílio de uma pipeta e colocada em um novo tubo. Junto com 50 µL de suspensão de sílica, a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vórtex. A mistura foi incubada em agitador por dez minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 12000 g, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo. O sedimento foi ressuspensionado em 800 µL de NaI e homogeneizado com o auxílio de vórtex. A mistura foi novamente centrifugada por 30 segundos a 12000 g e o sobrenadante foi descartado. O sedimento (DNA ligado a sílica) foi lavado duas vezes com 1 mL de tampão de lavagem (Etanol 60%, 50mM Tris-HCl pH8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Após centrifugação por 30 segundos a 12000 g, todo o tampão de lavagem foi descartado. Foi adicionado 1 mL de acetona e após homogeneização no vórtex e centrifugação por 30 segundos a 12000 g, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta, mantido a 55°C por 10 minutos. O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50 µL de TE 0,5X (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), levemente homogeneizado e incubado a 55°C por 10 minutos, sendo que, a seguir, o tubo foi centrifugado por dois minutos a 12000 g, para solidificar o sedimento. O sobrenadante foi removido com o auxílio de

uma pipeta, tendo-se o cuidado de não misturar a sílica novamente, que determinará a necessidade de novas centrifugações a 12000 g, para eliminar totalmente a sílica da amostra. Após centrifugação e coleta do DNA, as amostras foram estocadas em freezer a -20°C.

#### 5. Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoVue® (GE, Healthcare, Reino Unido) a 260nm, 280nm e sua razão.

#### 6. Oligonucleotídeos Iniciadores

Os iniciadores (*primers*) utilizados neste estudo foram desenhados com auxílio do programa *primer3plus* (Rozen e Skaletsky, 2000, disponível na URL <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>). Foram desenhados três iniciadores, dois externos e um interno. A partir do alinhamento das sequências disponíveis no GenBank em 2008. Na PCR foram usados os iniciadores CAVMGF 5'CCTGTTCCGACACATTGA3' correspondendo aos nucleotídeos 1444 a 1461 e o CAVMGR 5'TATGGCCTCTGCCTGTTA3' que corresponde aos nucleotídeos 2119 a 2136. Para a *semi-nested* PCR foi utilizado o iniciador CAVMGSN 5'GAATGAGGGATCCTTCAGCC3' que corresponde à posição 1489 – 1508 e o iniciador CAVMGR já descrito anteriormente. A posição dada aos nucleotídeos no genoma completo do CAV foi de acordo com a sequência da estirpe Cuxhaven-1 (M55918.1 GenBank).

## 7. Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e semi-nested-PCR para detecção do CAV e da região genômica que codifica a proteína VP1 (Fragmento B).

Uma alíquota de cada amostra de DNA total foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 50 µL contendo: 200ng de DNA, tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 0,4mM de dNTP, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de cada iniciador externo a 10pmol, 1UI de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura 18,2 MΩ q.s.p. Para o semi-nested foi utilizado 1 µL do produto da PCR, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP e 1 UI de Taq Polimerase. As condições de amplificação foram iguais para a PCR e para a semi-nested, com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, por anelamento a 52°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, além de uma extensão final a 72°C por 10 min, em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA). Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo DNA extraído da vacina comercial Nobilis CAVP4 da empresa Intervet International, Holanda e como controle negativo foi usado DNA extraído de tecidos de cinco aves SPF.

## 8. Sequenciamento do gene VP1

Para o sequenciamento de uma região de 1271nt do gene que codifica a proteína VP1 foram amplificados os fragmentos A e B. O

fragmento A foi sequenciado usando os iniciadores previamente descritos por Todd *et al.* (1992). O fragmento B foi sequenciado usando os iniciadores externos da PCR desenhados neste estudo (Quadro 4).

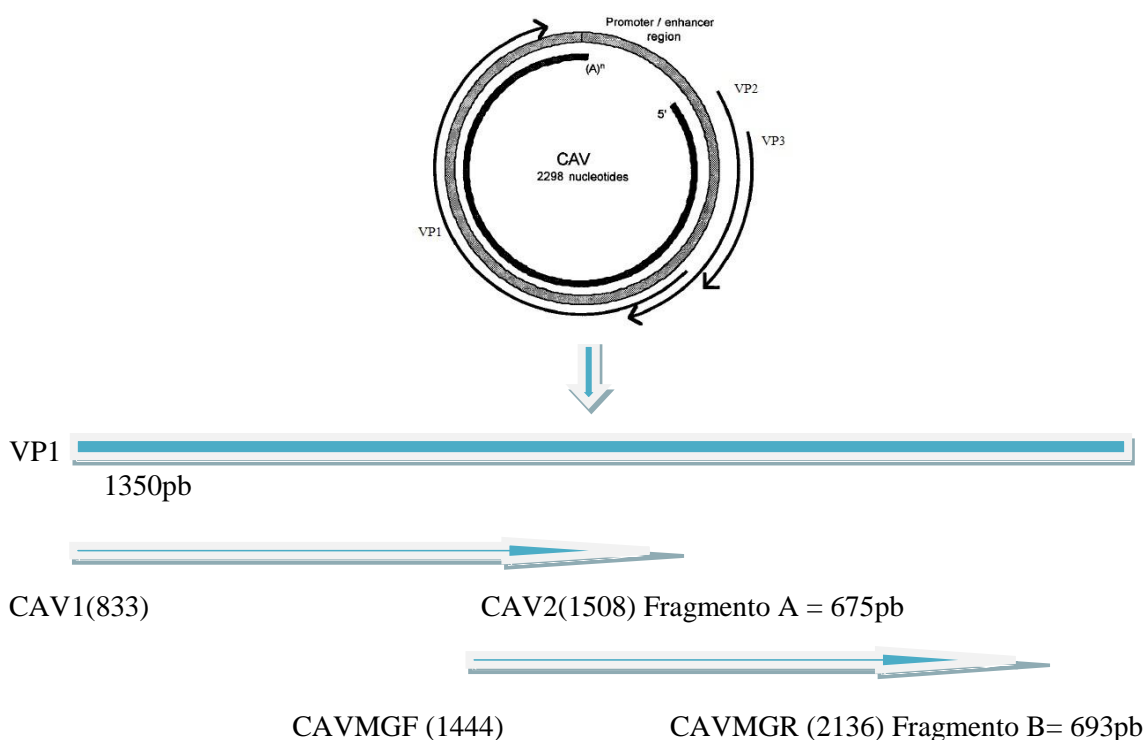
## 9. Condições da reação em cadeia pela polimerase (PCR) para sequenciamento da região genômica que codifica a proteína VP1 do CAV (Fragmento A).

Para a amplificação e sequenciamento do fragmento A foram usados os iniciadores CAV1F 5' GACTGTTAAGATGGCAAGACGAGCT 3' e CAV2F 5' GGCTGAAGGATCCCTCCATTC 3'. Na reação de amplificação, foram utilizados: 300ng de DNA, Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de cada iniciador externo a 10pmol, 1UI de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura 18,2 MΩ q.s.p 50µL. A PCR foi feita em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 s, 50°C por 60 s e 72°C por 90 s, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 min.

**Quadro 4.** Resumo dos iniciadores usados neste estudo para detecção de parte do genoma e para o sequenciamento da região que codifica a proteína VP1 do CAV (sequência de bases, localização no genoma e tamanho esperado).

Nome Oligo	Sequência (5'→3')	Localização no genoma*	Sentido	Segmento (pb)	Autores	Fragmento
CAV1	GACTGTTAAGATGGCAAGACGAGCT	833-856	+	675	Todd <i>et al.</i> , 1992	A
CAV2	GGCTGAAGGATCCCTCCATTC	1489-1508	-			
CAVMGF	GACTGTAAGATGGCAAGACGAGCT	1444-1461	+	693	Este estudo	B
CAVMGR	GGCTGAAGGATCCCTCCATTC	2119-2136	-			
CAVMGSN	GAATGAGGGATCCTTCAGCC	1489-1508	+			

\*Localização descrita em base na sequência Cuxhaven-1 (Número de acesso no GenBank M55918.1)



**Figura 2.** Representação esquemática da organização do CAV e a posição dos iniciadores usados para sequenciar a proteína VP1. Fragmento A e B foram designados neste trabalho para fins didáticos. O DNA de CAV é uma fita única que codifica 3 ORFs.

## 10. Análise dos produtos amplificados

A visualização dos produtos das PCRs e da *semi-nested* PCR foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25 mM EDTA e 50 mM ácido bórico). Por amostra foram utilizados 8 µL do produto amplificado, e adicionados 2 µL do tampão de amostra 2X (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol). A eletroforese foi efetuada a 100V por 40 minutos, sendo utilizado o padrão de tamanho molecular de 100 pb DNA Ladder (Promega). Imediatamente após a corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo na concentração de 10mg/mL e os resultados foram visualizados em um transiluminador UV (Macrovue, Hoefer/Pharmacia, EUA).

## 11. Purificação dos produtos da PCR com polietilenoglicol (PEG)

Os produtos da PCR foram purificados para serem utilizados na reação de sequenciamento. Foi usado o método descrito por Rosenthal *et al.* (1993) com modificações: ao produto da PCR (50µL) foi adicionado igual volume de uma solução de PEG 8000 a 20%. Após rápida agitação por 15 s, a solução foi incubada por 15 min a 37°C e centrifugada por 15 min a 13000 g. O sobrenadante foi retirado cuidadosamente com auxílio de pipeta e descartado. Sobre o sedimento foram adicionados lentamente e pelas paredes do tubo 125µL de etanol 80%. Após a lavagem do sedimento e centrifugação por 5 minutos, a lavagem foi repetida. Após descartar o sobrenadante por inversão do tubo, o tubo foi incubado a 37°C para secagem do etanol. De 10 a 15 µL de água ultra pura foram adicionados e o sedimento foi suspenso por pipetagem. O DNA purificado foi quantificado pela eletroforese em gel de agarose 1,5%, em

tampão de corrida TBE 0,5X e conservado a -20°C até sua utilização na reação de sequenciamento.

## 12. Sequenciamento genético

Os produtos amplificados e purificados foram sequenciados pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por Sanger *et al.* (1997), em um sequenciador automático capilar ABI 310® (Perkin Elmer, Estados Unidos), utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (*Applied Biosystems*, EUA), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Aproximadamente 1 µL amplicom foi utilizado em cada reação de sequenciamento, adicionando 1 µL de cada iniciador na concentração de 10 pmol F e R por separado, 1 µL de Big Dye, 1,5 µL de tampão Save Money (*Applied Biosystems*, EUA) e água ultra pura q.s.p. 10 µL. Esta reação de sequenciamento foi feita em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., EUA), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 96°C por 15 s, anelamento do iniciador a 50°C por 15 s, extensão a 60°C por 4 min, sendo esse ciclo repetido por 30 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando isopropanol e etanol e homogeneizado em formamida, sendo então feita a desnaturação rápida a 95°C por 2 min e colocado no gelo imediatamente. Cada amostra foi sequenciada em ambas as direções da dupla fita, tantas vezes quanto necessárias, para obter uma sequência confiável.

## 13. Análise das sequências nucleotídicas

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa BioEdit (Hall, 1999). Este programa permite editar e

excluir as ambiguidades, além de identificar os duplos picos dos eletroferogramas. Todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente quando necessário. O alinhamento das fitas consenso do fragmento A e B de cada amostra foram alinhados e se uniram para obter única fita de 1271 nucleotídeos da região codificadora de VP1 do CAV.

#### **14. Busca das sequências similares em bancos de dados**

Para início das análises, todas as sequências obtidas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os algoritmos dos programas BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*), BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), foram utilizados para a busca de similaridade entre os nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (Altschul *et al.*, 1997). Foram obtidas 20 sequências disponíveis no GenBank para realizadas comparações e análises filogenéticas deste estudo.

#### **15. Alinhamento das sequências**

As sequências de nucleotídeos e aminoácidos obtidas dos CAVs neste estudo foram alinhadas com as sequências de CAV disponibilizadas no GenBank no Clustal X (Thompson *et al.*, 1997) do programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 5.0 para Windows (Tamura *et al.*, 2011) e no programa BioEdit (Hall, 1999).

#### **16. Análises filogenéticas**

A análise filogenética das sequências de nucleotídeos e aminoácidos do gene codificante de VP1 foi feita usando o método *neighbor-joining*, com o programa MEGA 5.0. Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança em topologia (*Bootstrap*) com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas. Com o método de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetro (Kimura, 1980) e o método de substituição de aminoácidos JTT (Jones *et al.*, 1992). O programa MEGA 5.0 analisa as sequências e recomenda o melhor método para usar na análise filogenética.

Na Figura 1 estão resumidas as etapas do material e métodos deste trabalho, para um melhor entendimento.

#### **17. Referências Bibliográficas**

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; HAFFER, A. A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, v. 25 p. 3389-3402, 1997.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p. 615– 619, 1990.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p. 95-98, 1999.
- JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS*, v. 8, p. 275-282, 1992.



KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v.16, p. 111-120, 1980.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers". *Methods Mol. Biol.*, v.132, p. 365-386, 2000.

TAMURA K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content bases. *Mol. Biol. Evol.*, v.9, p. 678-687, 1992.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, v.28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS. USA*, v.74, p. 5463-5467, 1977.

ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.*, v. 21, n. 12, p. 173-174, 1993.

THOMPSON J. D.; GIBSON T. J.; PLEWNIAK F. *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, v. 24, p. 4876-4882, 1997.

TODD, D.; MAWHINNEY, K. A.; MCNULTY, M. S. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, n.30, p. 1661-1666, 1992.

## CAPITULO IV - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM AVES DE SUBSISTÊNCIA E DA AVICULTURA INDUSTRIAL EM MINAS GERAIS

### Resumo

No presente estudo se detectou o Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV) em 36,4% das granjas de aves de avicultura industrial, ao mesmo tempo em que na avicultura familiar ou de subsistência foi detectado o mesmo genoma em 35% das propriedades. Os testes foram feitos por semi-nested PCR desenvolvida neste estudo. Os genomas de dez amostras provenientes da avicultura industrial e de sete amostras provenientes da avicultura familiar de Minas Gerais foram sequenciados e geraram um fragmento de 1271 nucleotídeos que codificam parcialmente a proteína VP1 do CAV. Estas amostras mostraram similaridade de nucleotídeos de 93,7 a 99,5%, quando comparadas com 20 seqüências de diferentes partes do mundo depositadas no GenBank. Da mesma maneira, a similaridade entre aminoácidos variou de 96,6 a 100% entre as amostras deste estudo e as depositadas no GenBank. Em três amostras pertencentes à produção de frangos de corte da Zona da Mata de Minas Gerais e da região metropolitana de Belo Horizonte - MG foi encontrado o aminoácido F na posição 98, substituição esta que parece específica de amostras brasileiras. A maior variação nas amostras mineiras do genoma que codifica a VP1 se observou nos aminoácidos das posições 22,75,97, 139,144, 287 e 370.

### Introdução

A avicultura industrial tem uma posição de destaque na economia brasileira, empregando mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e respondendo por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O frango brasileiro está presente em mais de 150 países em todo o mundo, fornecendo proteína de origem animal de alto valor nutricional e baixo custo. No mundo, o Brasil é o maior exportador de frangos de corte e o terceiro maior produtor (UBABEF, 2011).

As doenças imunodepressoras têm importância na avicultura porque estão frequentemente associadas a infecções secundárias provocadas por vírus, bactérias, fungos e parasitos, o que aumenta significativamente os custos de produção com tratamentos, falhas na vacinação e

condenação ao abate (McNulty *et al.*, 1991; Brentano, 2009).

As galinhas são o único hospedeiro natural conhecido do vírus. No Brasil, estudos sorológicos de prevalência em matrizes mostraram que o CAV está amplamente disseminado na avicultura industrial, havendo alta prevalência nas regiões onde a avicultura industrial está mais presente (Brentano *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2005).

Toro *et al.* (2006) fizeram um levantamento sorológico nos Estados Unidos em amostras de soros colhidas entre 1959 e 1975 e detectaram anticorpos na maior parte das amostras (entre 43% a 100%), sugerindo que a ocorrência do vírus é anterior ao seu primeiro isolamento. O CAV já foi identificado e caracterizado em várias partes do mundo, confirmando sua presença em diferentes criações de aves sejam comerciais ou de subsistência e no comércio de aves vivas (Ducatez *et al.*,

2008; Oluwayelu e Todd, 2008; Barrios *et al.*, 2009; Craig *et al.*, 2009).

No Brasil, Brentano *et al.* (1991) isolaram e identificaram o CAV, pela primeira vez, em frangos de corte que apresentavam sinais de anemia, atrofia dos órgãos linfóides, desuniformidade, imunodepressão e baixos índices produtivos. Usaram, para isso, anticorpos monoclonais específicos para este vírus. Desde então, vários estudos têm sido feitos no Brasil, embora tenham sido publicados apenas dois trabalhos (Simionatto *et al.*, 2006; Nogueira *et al.*, 2007), os quais sequenciaram fragmentos de DNA que codificam parcialmente as proteínas VP1, VP2 e VP3 das amostras brasileiras. No GenBank só se encontram depositadas 27 estirpes brasileira de CAV (busca no Gen Ban data 24/10/2012). No Brasil, o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas nunca foi sequenciado em sua totalidade. Com isso podemos concluir que existe pouca informação sobre a filogenia das amostras brasileiras.

O objetivo deste trabalho foi detectar e caracterizar molecularmente o genoma que codifica a proteína VP1 de CAV de amostras de aves de subsistência e de produção em Minas Gerais e estabelecer sua relação filogenética com outras estirpes depositadas no GenBank. Para isso foram sequenciadas 1271 nucleotídeos de um total de 1350nt que codificam a proteína VP1 do CAV.

## Material e Métodos

### Amostras

Foram investigadas 74 granjas, 54 delas de frangos de corte e 20 de poedeiras comerciais, em diferentes localidades do estado de Minas Gerais. Além disso, foram testadas 74 galinhas provenientes de avicultura familiar de diferentes localidades do mesmo estado, com e sem sinais clínicos

da doença. Estas amostras foram coletadas entre os anos de 2006 a 2011. Nenhuma das aves testadas estava vacinada contra o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, já que as vacinas comerciais são unicamente para matrizes comerciais, enquanto na avicultura de subsistência essa vacina não é usada.

Amostras de baço, timo, fígado e bolsa cloacal foram coletadas entre 2006 e 2011 de aves com diferentes sinais clínicos e com doença clínica para outros agentes diferentes de CAV (exemplos: Doença Infecciosa Bursal, Mycoplasmoses, Reovirus, Coriza infecciosa das galinhas, coccidiose, endoparasitos, blastocystis) ou sadios.

### Extração e amplificação do DNA

O ácido nucleico dos tecidos foi extraído usando o método de Sílica com iodeto de Sódio (6M), seguindo o protocolo previamente descrito por (Boom *et al.*, 1990). A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoVue® (GE, Healthcare, UK Ltda).

### Iniciadores

Os iniciadores (primers) utilizados neste estudo foram desenhados com ajuda do programa primer3plus (Rozen e Skaletsky, 2000), ao qual se pode ter acesso através do link <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>. Foram desenhados três iniciadores, dois externos e um interno. A partir do alinhamento das sequências disponíveis no GenBank em 2008. Na PCR foram usados os iniciadores CAVMGF 5'CCTGTTCCGACACATTGA3' e o CAVMGR 5'TATGGCCTCTGCCTGTTA3'. Para a semi-nested PCR foi utilizado o iniciador CAVMGSN 5'GAATGAGGGATCCTTCAGCC3' e o

iniciador CAVMG R já descrito anteriormente (Quadro 1).

### PCR para diagnóstico

Uma alíquota de cada amostra de DNA total foi utilizada como molde na reação de amplificação, com volume final de 50 µl contendo: 200ng de DNA, tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 0,4mM de dNTP, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de cada iniciador externo a 10pmol, 1UI de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura milliQ q.s.p. Para o semi-nested foi utilizado 1 µl do produto da PCR, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTP e 1 UI de Taq Polimerase. As condições de amplificação foram iguais para a PCR e para a semi-nested, com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, por anelamento a 52°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos, em termociclador (modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA). Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo DNA extraído da vacina comercial Nobilis CAVP4 da empresa Intervet International, Holanda.

### Sequenciamento do gene VP1

Para o sequenciamento de uma região de 1271nt do gene que codifica a proteína VP1 foram amplificados os fragmentos A e B. O fragmento A foi sequenciado usando os iniciadores previamente descritos por Todd *et al.* (1992). O fragmento B foi sequenciado usando os iniciadores externos desenhados neste estudo para a PCR (Quadro 1).

Para a amplificação e sequenciamento do fragmento A foram usados os iniciadores CAV1F

5'GACTGTTAAGATGGCAAGACGAGC T3' e CAV2F

5'GGCTGAAGGATCCCTCCATTC3'

(Quadro 1). Na reação de amplificação, foram utilizados: 300ng de DNA, Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de cada iniciador externo a 10µmol, 1U de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p 50µL. A PCR foi feita em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 60 seg e 72°C por 90 seg, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 min.

**Quadro 1.** Resumo dos iniciadores usados neste estudo para detecção do genoma e para sequenciamento da região que codifica a proteína VP1 do CAV.

Nome Oligo	Sequência (5' ->3')	Localizaçã o no genoma*	Sentido	Segmento (pb)	Autores	Fragmento
CAV1	GACTGTTAAGATGGCAAGACGAGC T	833-856	+	675	Todd <i>et al.</i> , 1992	A
CAV2	GGCTGAAGGATCCCTCCATTC	1489-1508	-			
CAVMGF	GACTGTAAGATGGCAAGACGAGCT	1444-1461	+	693	Este estudo	B
CAVMGR	GGCTGAAGGATCCCTCCATTC	2119-2136	-			
CAVMGSN	GAATGAGGGATCCTTCAGCC	1489-1508	+	648		

\*Localização descrita em base na sequência Cuxhaven-1 (Número de acesso no GenBank M55918.1 )

### **Análise dos produtos amplificados pelos ensaios de PCR**

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo (10mg/ml). A eletroforese ocorreu a 100V em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen).

### **Purificação dos produtos da PCR para sequenciamento com PEG**

Para a purificação do produto da PCR foi usado o método descrito por Rosenthal *et al.* (1993) com modificações.

### **Sequenciamento genético**

Os produtos amplificados e purificados foram sequenciados pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por Sanger *et al.* (1997), utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Os produtos da extensão foram analisados em um sequenciador automático por eletroforese capilar (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer), no laboratório de Genética do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e as sequências geradas foram analisadas.

### **Análises Filogenéticas**

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa BioEdit (Hall, 1999). Todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências

disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com as sequências de CAV depositadas no GenBank com o auxílio do programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), implementado no programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis MEGA versão 5.0 e no programa BioEdit para Windows (Tamura, *et al.*, 2011).

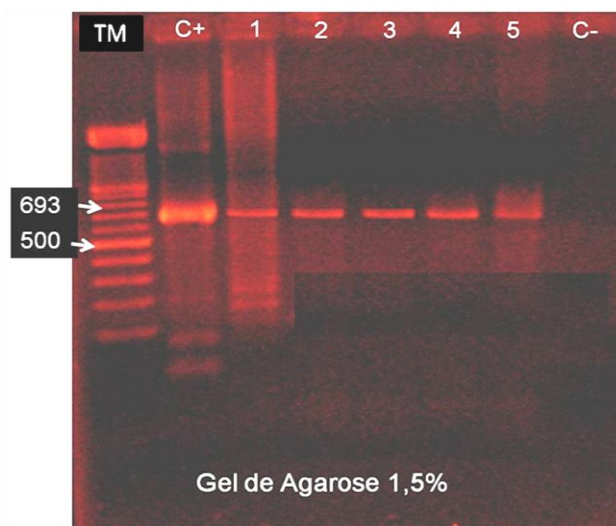
A análise filogenética dos nucleotídeos e dos aminoácidos do gene VP1 foi feita usando o método neighbor-joining, com o programa MEGA 5.0. Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas. Com o método de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetro (Kimura, 1980) e o método de substituição de aminoácidos JTT (Jones *et al.*, 1992).

## **Resultados e Discussão**

### **PCR e Semi-nested PCR**

Foram desenhados iniciadores neste trabalho com o objetivo de amplificar parte do gene que codifica a proteína VP1 do CAV. Para garantir sua especificidade e sensibilidade foram avaliadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), dNTPs, Taq Polimerase, DNA molde e diferentes temperaturas de anelamento, tanto na PCR como na semi-nested PCR. Observou-se que, na temperatura de 52°C para a *semi-nested* não houve comprometimento da especificidade e ocorreu uma boa sensibilidade da reação, em diferentes concentrações de MgCl<sub>2</sub>, visualizando-se que o aumento da concentração de MgCl<sub>2</sub> até 2mM, foram benéficos à sensibilidade do teste. Com relação à temperatura de anelamento, 52°C

justificou-se pelo aparecimento de menor número de bandas inespecíficas e uma banda específica de melhor nitidez e intensidade.



**Figura 1.** Eletroforese de DNA em gel de Agarose 1,5%. TM: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder (Promega), C+ controle positivo, C- controle negativo. 1-5 amostras testadas da avicultura familiar e industrial positivas.

A otimização das PCRs para os CAVs deste trabalho permitiu visualizar o produto do tamanho esperado no gel de agarose do controle positivo (Vacina, Nobilis® CAV P4; Intervet, Holanda) e das amostras clínicas. Outras amostras só amplificaram depois da semi-nested PCR isto pode ter sido porque a semi-nested permitiu melhorar a sensibilidade e especificidade, especialmente de amostras onde a doença está na forma subclínica. A associação de um método de extração e purificação de DNA eficiente com um protocolo de semi-nested PCR adequado possibilitou a detecção do CAV em vários tecidos, soro, sangue e fezes (resultados não mostrados aqui). A sensibilidade da semi-nested PCR foi determinada a partir de diluições seriadas da vacina contra CAV (Nobilis® CAV P4; Intervet B.V., Holanda) e foi

possível detectar até 0,15 TCID<sub>50</sub> e a especificidade com 10 amostras de tecidos de aves SPF sabidamente negativas para CAV e livres de anticorpos contra o vírus.

#### Detecção do genoma de CAV

Com o objetivo de detectar o genoma de CAV em diferentes espécies de aves foram testadas amostras recebidas no Laboratório de Doenças das Aves durante o período de 2006 a 2011. No laboratório foram feitas as necropsias e coletados os tecidos para diagnóstico da anemia (baço, fígado, timo, bolsa cloacal e tecidos reprodutivos). Estas amostras foram coletadas de aves tanto da avicultura industrial, como de subsistência e silvestres. Nas aves silvestres testadas neste trabalho e outras aves domésticas como pombos e patos, não houve detecção do genoma de CAV. No laboratório foram

recebidas amostras de frangos de corte, positivas para o vírus da doença infecciosa bursal (DIB), Reovirus (Rios, 2010), para diagnóstico de CAV, nos quais constataram-se co-infecções. Na avicultura de subsistência foram testadas, quanto à presença do CAV, propriedades em diferentes microrregiões do estado de Minas Gerais. Foram usadas no estudo aves de diferentes idades, linhagens e raças, a maioria com problemas parasitários.

De 74 amostras da avicultura industrial examinadas, 27 foram positivas para o CAV (36,4%), das quais dez foram escolhidas aleatoriamente para a análise filogenética. De 74 amostras de aves de subsistência 26 (35%) amostras foram positivas, sendo sete delas sequenciadas, das quais, duas destas foram obtidas de uma mesma ave, do timo e baço. No Brasil, estudos sorológicos em matrizes pesadas mostraram que o CAV está amplamente disseminado na avicultura industrial, com alta prevalência nas regiões de alta densidade avícola (Brentano *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2005). Em Minas Gerais, Gomes *et al.* (2005) demonstraram que 97,2% das matrizes de frangos de corte da avicultura industrial apresentaram sorologia positiva para CAV (ELISA) a partir da 17ª semana de idade. Embora os dados da soroprevalência sejam altos, neste estudo foram avaliados lotes de aves da avicultura industrial com e sem sinais de imunodepressão, considerando que a ausência de anticorpos não indica exatamente a ausência do vírus. Outro fator a considerar é que, enquanto o estudo conduzido por Gomes *et al.* (2005) foi feito em dois lotes de matrizes pesadas em uma região menor, o presente trabalho teve maior número de lotes de várias microrregiões de Minas Gerais da avicultura industrial e familiar. Com isso, o presente estudo reforça a hipótese de que o vírus se encontra disseminado tanto na avicultura familiar como na industrial de

Minas Gerais. Acredita-se como uma das origens possíveis de CAV, o uso de vacinas de vírus vivo contaminado com o genoma de CAV (Barrios *et al.*, 2012), além da presença de CAV nas linhagens industriais antes da descoberta do mesmo e implantação de programas de controle (Toro *et al.*, 2006), além de falhas na biossegurança e a alta resistência do vírus à inativação física e química, o que permite sua permanência de infecciosidade por muito tempo no ambiente (Gomes *et al.*, 2005; Schat e Van Santen, 2008; Barrios *et al.*, 2009). Barrios *et al.*, 2009 detectaram o genoma de CAV em 30% das aves de subsistência na Região Metropolitana de Belo Horizonte, usando nested-PCR. No presente estudo, detectaram-se taxas semelhantes, em que o genoma de CAV foi encontrado em 34% das propriedades testadas.

Nos casos positivos de CAV na avicultura industrial, as doenças concomitantes mais frequentemente observadas foram à doença infecciosa bursal (DIB) detectada por RT-PCR e pelas lesões histopatológicas (dados não publicados), reovirose (*Orthoreovirus*) detectada através de RT-PCR (Rios, 2010) e coccidiose por visualização dos oocistos no microscópio.

Na avicultura familiar ou de subsistência, observou-se 38,5% das aves reagentes para *Mycoplasma gallisepticum* (teste de soroprecipitação rápida) e CAV, seguida de co-infecções por *Eimeria* (microscopia direta). A coriza infecciosa também foi um achado clínico comum (Tabela 1). O diagnóstico destas doenças concomitantes foi realizado no Laboratório de Doenças das Aves da UFMG e na UFV, como parte da rotina de diagnósticos destes laboratórios.

O CAV potencializa infecções causadas por outros patógenos oportunistas ou primários, provocando diminuição da produtividade e gerando altas perdas econômicas pelo

aumento da mortalidade, falhas na vacinação, tratamento de infecções bacterianas ou parasitárias e diminuição do crescimento e da eficiência da conversão alimentar (McNulty *et al.*, 1991; Simionatto *et al.*, 2006). Tal condição pareceu ocorrer nas aves industriais que apresentavam co-infecção, especialmente demonstrada nas co-infecções por *Orthoreovirus* (Tabela 1) inclusive nas de avicultura familiar, em que se observou um quadro de imunodepressão aparentemente mais intenso com doenças multifatoriais e aumento da mortalidade. A severidade da infecção por CAV pode ser influenciada pela presença de outras doenças concomitantes, da idade da ave, dose infectante e via de transmissão

(Brentano, 2009). No presente trabalho, as aves da avicultura familiar testadas para a presença de CAV tinham idade variável, desde animais jovens, com cerca de 30 dias, até aqueles com mais de 20 semanas de idade, implicando que a idade da ave pode não ter sido determinante para a presença de sinais clínicos demonstrados pelas aves positivas ao CAV. Foram encontradas aves adultas com sinais clínicos de anemia, condição que poderia resultar da associação de outras doenças imunodepressoras, as quais poderiam impedir o desenvolvimento de proteção contra CAV, como no caso de co-infecção com DIB, doença de Marek e micotoxinas.

**Tabela 1.** Percentual de co-infecção de CAV e outros agentes diagnosticados no Laboratório de Doenças das Aves da Escola Veterinária da UFMG (2006-2011) em porcentagens.

	IBDV	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	<i>Orthoreovirus</i>	Coccidiose (sp.)	Coriza Infecciosa	<i>Blastocystis hominis</i>	Endo-parasitos	Gastrite por megabactéria
<b>Avicultura Industrial</b>	25,92	3,7	14,8	7,4	3,7	7,4	3,7	0
<b>Avicultura Familiar</b>	3,8	38,5	ND	26,9	15,4	11,5	23	7,5

ND: não diagnosticado

Foi observado neste trabalho e por outros autores (Oluwayelu e Todd, 2008; Barrios *et al.*, 2009) que o CAV não é um vírus exclusivo da avicultura industrial e se encontra favorecido pelas precárias condições de manejo geral e sanitário da avicultura familiar. Nessa modalidade de avicultura, os desafios são ainda maiores, com conceitos de biossegurança, isolamento e nutrição não considerados ou tratados de forma rudimentar. Isso explicaria a presença de aves positivas e a alta frequência de co-infecções por outros agentes. Segundo Barrios *et al.* (2009) e Oluwayelu *et al.* (2010), CAV pode passar da avicultura comercial para a avicultura de subsistência ou vice-versa, significando que as galinhas de subsistência contribuiriam

para a disseminação e persistência do vírus, além de serem hospedeiras ideais para variabilidade genética.

### Análise Filogenética

Neste trabalho foi sequenciado parte do DNA de CAV diretamente de amostras clínicas (Quadro 2) sem isolamento ou passagem por cultivo celular para evitar potenciais mudanças genéticas *in vitro* durante a adaptação em cultivos celulares ou inoculação em aves suscetíveis (SPF de um dia de vida) (Van Santen *et al.*, 2001; Simionato *et al.*, 2006).



**Quadro 2.** Histórico clínico-patológico dos plantéis dos quais estirpes de CAV foram sequenciadas em Minas Gerais.

Identificação sequência	Idade (dias)	Tecido	Histórico clínico-patológico	Local	Data
<b>Frangos de corte</b>					
CAVAI15/2006	15	Timo	Lesões sugestivas de micotoxinas, atrofia de órgãos linfóides, refugagem.	Zona da Mata, MG	2006
CAVAI263/2006	15	Bolsa cloacal	Refugagem e desuniformidade, atrofia de órgãos linfóides.	Zona da Mata, MG	2006
CAVAI240/2008	25	Timo	Atrofia de órgãos linfóides, aumento na mortalidade; PCR positiva para doença infecciosa bursal.	Zona da Mata, MG	2008
CAVAI206/2008	42	Baço	Celulite, Imunodepressão, PCR positiva para doença infecciosa bursal.	Sudoeste de MG	2008
CAVAI140/2008	42	Baço	Sadio	Sudoeste de MG	2008
CAVAI1013/2010	42	Timo	Sadio	Região Metropolitana de Belo Horizonte	2010
CAVAI632/2009	33	Baço	PCR positiva para <i>Orthoreovirus</i> , claudicação, refugagem.	Região Metropolitana de Belo Horizonte	2009
CAVAI976AI/2010	43	Bolsa Cloacal	Sadio	Região Metropolitana de BH	2010
CAVAI1221/2010	42	Timo	Diarréia, <i>Blastocystis hominis</i> .	Oeste de Minas	2010
<b>Frangos de Postura</b>					
CAVAI1136/2006	12 semanas	Timo	Atrofia de órgãos linfóides, medula óssea pálida.	Zona da Mata	2006
<b>Avicultura Familiar</b>					
CAVAF346/2005	>24 semanas	Timo	Coccidiose	Belo Horizonte	2005
CAV584/2009	35	Timo	Coccidiose, baço, fígado e medula óssea pálidos. Atrofia de órgãos linfóides, <i>Blastocystis hominis</i> .	Congonhas	2009
CAVAF585/2009	35	Baço	Coccidiose, baço, fígado e medula óssea pálidos. Atrofia de órgãos linfóides, <i>Blastocystis hominis</i> .	Congonhas	2009
CAVAF841/2010	>20 semanas	Timo	Verminose, mortalidade, <i>Tetrameres sp.</i> no proventrículo.	Sabará	2010
CAVAF1086/2010	>20 semanas	Timo	Desnutrição; aerossaculite caseosa; gastrite por <i>Macrorhabdus ornithogaster</i>	São Vicente de Minas	2010
CAVAF740/2009	12 semanas	Timo	Verminoses, atrofia de órgãos linfóides, aerossaculite, infecção por <i>Heterakis gallinarum</i> (cecos).	Belo Horizonte	2009
CAVAF1029/2010	>20 semanas	Timo	Lesões sugestivas de Coriza, ectoparasitos, PCR positiva para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .	Betim	2010

A co-infecção por mais de um CAV foi evidenciado neste estudo, demonstrado pela observação de diferenças genéticas em vírus detectados no baço e timo de uma mesma ave, originária da avicultura familiar. Os CAVs em co-infecção foram agrupados em grupos genômicos diferentes na análise de nucleotídeos, denominadas CAVAF584/2009 e CAVAF585/2009, com similaridade de 97% (Tabela 2). Simionatto *et al.* (2006) também encontraram mais de uma sequência para o mesmo produto amplificado de CAV sugerindo diversidade

de estirpes de CAV co-infectando a mesma ave. Oluwayelu *et al.* (2008) sugerem que tanto as galinhas da avicultura familiar como da avicultura comercial podem sofrer co-infecção com mais de uma estirpe do CAV. Ducatez *et al.* (2006) relataram a presença de infecção mista por CAV. Segundo Van Santen (2001) a presença de mais de uma estirpe de CAV na mesma galinha ou lote pode propiciar fenômenos de recombinação genética. He *et al.* (2007), por sua vez, demonstraram a existência de estirpes de CAV recombinantes.

**Tabela 2.** Identidade (em %) entre 423 aminoácidos deduzidos da VP1 das estirpes mineiras de CAV e de outras partes do mundo\*.

	CAV 1221/ 2010	CAV 346/ 2005	CAV 740/ 2009	CAV 976/ 2010	CAV 584/ 2009	CAV 140/ 2008	CAV 841/ 2010	CAV 206/ 2008	CAV 263 /2006	CAV 1136/ 2006	CAV 632/ 2009	CAV 1013/ 2010	CAV 585/ 2009	CAV 1086/ 2010	CAV 15/ 2006	CAV 1029/ 2010	CAV 240/ 2008
Cuxhaven-1	97,8	97,6	97,6	97,8	97,8	97,6	98,1	97,6	97,3	98,3	97,3	97,8	97,6	97,1	97,8	97,8	97,6
26P4	98,6	97,8	97,8	98,6	98,1	98,3	98,8	98,1	97,8	98,3	97,8	98,1	98,1	97,6	98,3	98,3	98,1
CIA-1	99,0	99,0	99,0	98,6	99,3	98,8	99,3	99,0	97,1	99,8	97,8	99,3	99,0	98,6	97,6	99,5	99,5
ArgA001028	99,5	98,3	98,3	99,0	98,6	99,8	99,8	99,0	97,3	98,8	98,1	98,6	98,6	98,6	97,8	99,0	99,5
BD-3	98,6	99,5	99,5	98,8	99,8	98,8	98,8	99,0	97,3	99,8	97,6	99,8	99,0	99,0	97,8	99,3	99,0
CH_CK/04-01/GD/98	99,0	99,0	99,0	98,8	99,3	98,8	99,3	99,3	97,1	99,5	97,6	99,3	99,3	98,8	97,6	100,0	99,5
704	98,8	99,0	99,0	98,8	99,3	99,0	99,0	99,8	97,1	99,5	97,3	99,3	99,3	99,3	97,6	99,5	99,8
SMSC-1	98,3	98,6	98,6	98,3	98,8	98,6	98,6	99,3	96,6	99,0	96,9	98,8	98,8	98,8	97,1	99,0	99,3
3711	98,3	98,3	98,3	98,6	98,6	98,3	98,6	97,8	98,6	98,3	98,6	98,6	98,3	97,6	99,0	98,1	97,8
Lanlate.NIE/ 11.02/12	98,8	98,1	98,1	98,8	98,3	98,6	99,0	98,3	98,1	98,6	98,1	98,3	98,3	97,8	98,6	98,6	98,3
India	97,8	97,6	97,6	97,8	97,8	97,6	98,1	97,6	97,3	98,3	97,3	97,8	97,6	97,1	97,8	97,8	97,6
CAV-B	98,6	99,5	99,5	98,8	99,8	98,8	98,8	99,0	97,3	99,8	97,6	99,8	99,0	99,0	97,8	99,3	99,0
98D06073	98,8	99,0	99,0	98,6	99,3	98,6	99,0	99,0	97,1	99,8	97,6	99,3	99,0	98,6	97,6	99,8	99,3
Karnataka	97,8	97,8	97,8	98,6	98,1	97,8	98,1	97,3	99,0	97,8	99,0	98,1	97,8	97,1	99,5	97,6	97,3
SH16	98,1	98,1	98,1	98,3	98,3	98,1	98,3	97,6	98,8	98,1	98,8	98,3	98,1	97,3	99,3	97,8	97,6
ANAND	99,0	99,3	99,3	99,0	99,5	98,8	99,3	99,5	97,4	99,8	97,6	99,5	99,5	99,0	97,8	99,8	99,5
Del-Ros	98,3	98,3	98,3	98,6	98,6	98,3	98,6	97,8	98,6	98,3	98,6	98,6	98,3	97,6	99,0	98,1	97,8
Pallister	98,1	98,1	98,1	98,3	98,3	98,1	98,3	97,6	98,3	98,1	98,3	98,3	98,1	97,3	98,8	97,8	97,6
G-6	98,8	99,0	99,0	98,8	99,3	99,0	99,0	99,8	97,1	99,5	97,3	99,3	99,3	99,3	97,6	99,5	99,8
CH_CK/04-12/GD/7616	98,8	99,0	99,0	98,6	99,3	98,6	99,0	99,0	97,1	99,8	97,6	99,3	99,0	98,6	97,6	99,8	99,3

\*Em negrito identidade de  $\geq 99,8$ .

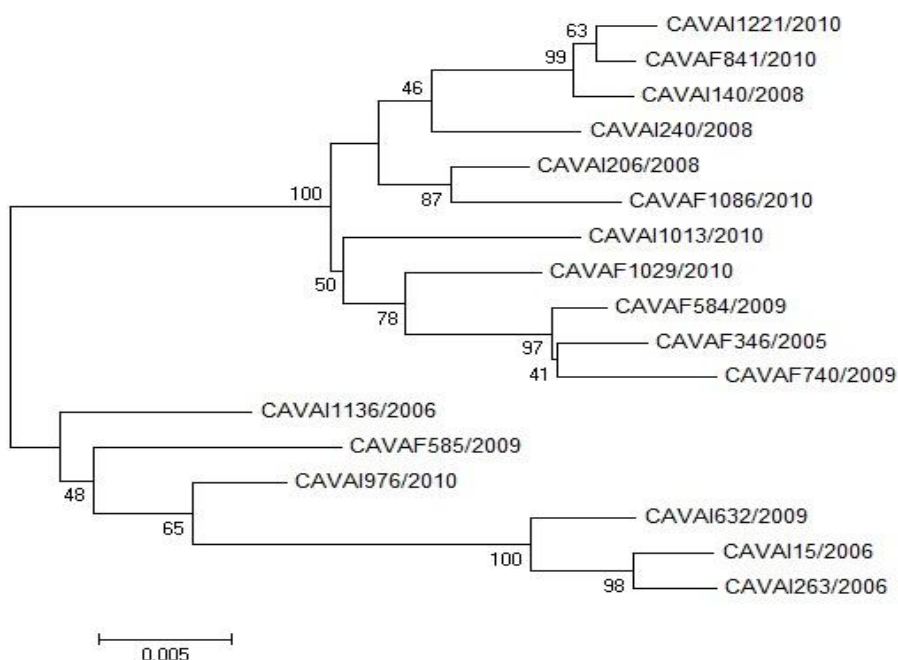
**Tabela 3.** Identidade (em %) de nucleotídeos (1271) e aminoácidos (423aa) deduzidos da VP1 entre as sequências obtidas de Minas Gerais.

		Aminoácidos																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	
Nucleotídeos	1	CAVAI1221/2010		98,3	98,6	99,0	98,6	99,3	99,8	99,0	97,4	98,8	98,1	98,6	98,6	98,1	97,8	99,0	99,0
	2	CAVAF346/2005	97,4		99,5	98,6	99,8	98,6	98,6	98,8	97,3	99,3	97,6	99,8	98,8	98,8	97,8	99,0	98,8
	3	CAVAF740/2009	97,4	99,0		98,6	99,8	98,6	98,6	99,0	97,3	99,3	97,6	99,8	98,8	98,8	97,8	99,0	98,8
	4	CAVAI976/2010	97,0	96,5	96,2		98,8	99,0	99,3	98,6	98,1	98,8	98,3	98,8	98,6	98,3	98,6	98,8	98,6
	5	CAVAF584/2009	97,4	99,4	99,1	96,6		98,8	98,8	99,0	97,6	99,5	97,8	100,0	99,0	99,0	98,1	99,3	99,0
	6	CAVAI140/2008	99,4	97,5	97,4	96,9	97,6		99,5	98,8	97,3	98,6	98,1	98,8	98,3	98,8	97,8	98,8	99,3
	7	CAVAF841/2010	99,6	97,4	97,4	97,1	97,5	99,6		98,8	97,6	99,0	98,3	98,8	98,8	98,3	98,1	99,3	99,3
	8	CAVAI206/2008	98,6	98,1	97,9	96,8	98,2	98,6	98,6		96,9	99,3	97,1	99,0	99,0	99,0	97,3	99,3	99,5
	9	CAVAI263/2006	95,0	95,0	94,9	97,6	95,1	94,9	95,1	94,9		97,4	99,0	97,6	96,9	96,8	99,5	97,1	96,9
	10	CAVAI1136/2006	96,9	96,4	96,3	98,0	96,5	96,7	96,9	97,0	96,7		97,6	99,5	99,3	98,8	97,8	99,5	99,3
	11	CAVAI632/2009	95,4	95,4	95,1	98,0	95,4	95,3	95,5	94,9	99,0	97,1		97,8	97,1	96,8	99,5	97,6	97,6
	12	CAVAI1013/2010	97,9	97,9	97,9	96,6	98,2	97,8	97,8	98,4	95,3	97,0	95,2		99,0	99,0	98,1	99,3	99,0
	13	CAVAF585/2009	96,0	96,8	96,7	97,8	97,0	95,8	96,0	96,4	97,2	98,4	97,4	96,6		98,6	97,4	99,3	99,0
	14	CAVAF1086/2010	98,0	98,0	97,6	96,4	98,1	98,3	98,1	99,0	94,4	96,8	94,7	97,9	96,0		97,1	98,8	99,0
	15	CAVAF15/2006	95,0	94,9	94,9	97,6	95,3	94,9	95,1	94,9	99,4	96,7	98,8	95,3	97,2	94,4		97,6	97,3
	16	CAVAF1029/2010	97,9	98,6	98,2	96,9	98,9	97,9	98,0	98,6	95,1	96,9	95,5	98,3	96,9	98,4	95,3		99,5
	17	CAVAI240/2008	98,4	97,7	97,2	97,4	97,9	98,7	98,6	98,5	95,4	97,4	95,9	97,8	96,8	98,2	95,6	98,4	

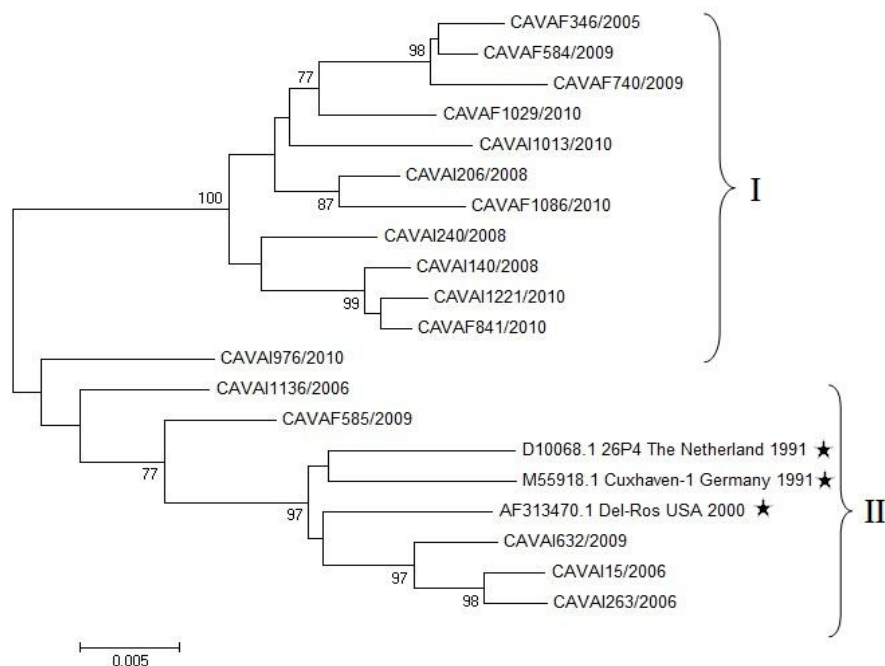
Em negrito identidade de  $\geq 99,3$ .

A análise filogenética dos nucleotídeos e aminoácidos das amostras deste estudo evidencia a formação de dois grupos genéticos (Figura 2), não ocorrendo separação dos CAVs detectados na avicultura industrial e familiar. As sequências obtidas neste estudo e as estirpes vacinais usadas na produção de vacinas

contra CAV no Brasil foram relacionadas filogeneticamente na Figura 3. Observou-se a formação de dois grupos genéticos, o primeiro só com estirpes do presente estudo e o segundo com outras sequências oriundas da avicultura industrial e as estirpes vacinais disponíveis no GenBank.



**Figura 2.** Árvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método *neighbor-joining* com as sequências de nucleotídeos (1271) geradas neste estudo para parte do segmento codificante de VP1 de CAVs. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos Kimura-2. Legenda: CAVs obtidos da avicultura familiar (CAVAF) e industrial (CAVAI).



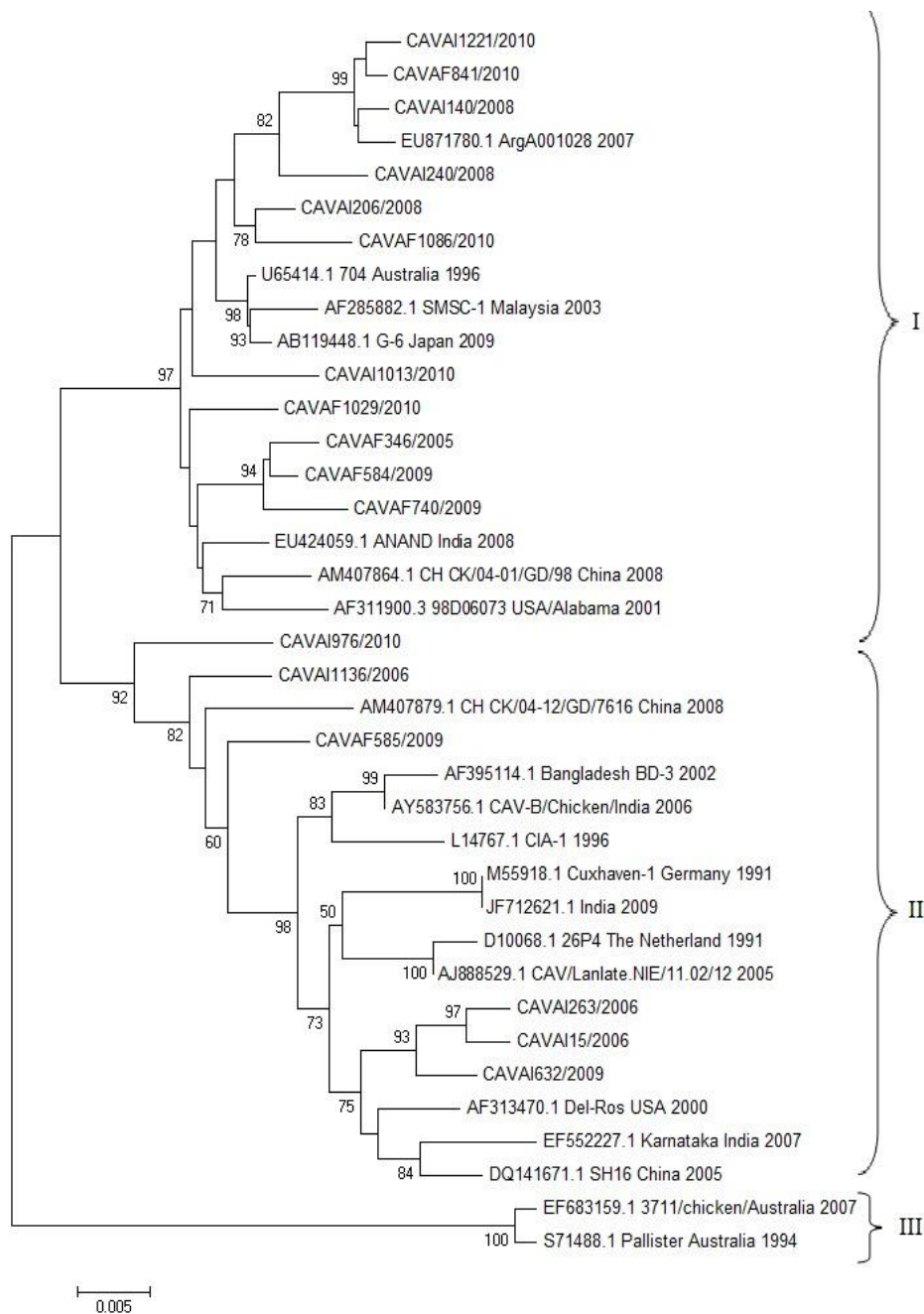
**Figura 3.** Arvore Filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método *neighbor-joining* com as sequencias geradas neste estudo (1.271 nucleotídeos) e as sequencias das estirpes vacinais do GenBank\* de parte do segmento codificante da VP1 de CAVs. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Boostrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de nucleotídeos Kimura-2. Legenda: CAVs obtidos da avicultura familiar (CAVAF) e industrial (CAVAI). As sequencias CAVAF584 e CAVAF585 foram obtidas da mesma ave. Estirpes vacinais\*.

### Análise da sequencia nucleotídica

A análise da sequencias nucleotídicas de 1271 bp da posição 853 a 2123 enumeradas de acordo com a sequência da estirpe Cuxhaven-1 (M55918.1 GenBank) compreendendo a região hipervariável da proteína VP1 revelou uma distancia genética entre os fragmentos amplificados de 6,6% a 0,4% das sequencias mineiras.

Na análise filogenética dos 1271 nucleotídeos das sequências mineiras e as estirpes do GenBank se obteve um dendrograma com três grupos genômicos

com *Boostrap* >70 (Figura 4). He *et al.* (2007) reportaram que as estirpes de CAV podem ser agrupadas em três genótipos diferentes, identificados como A, B e C. Seguindo o padrão de agrupamento proposto por esses autores, a maioria das amostras do presente estudo, num total de 11, foi classificada como sendo do genótipo B, junto com as amostras G-6 (Japão) e 704 (Austrália) e a estirpe 98D06073 (Alabama, EUA). As outras seis sequencias foram agrupadas no genótipo A, junto com as estirpes Cuxhaven-1 (Alemanha), 26P4 (Holanda), Del Ros (EUA) e SH16 (China) (Figura 4).



**Figura 4.** Arvore filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método *neighbor-joining* com as sequências do GenBank, além das geradas neste estudo (1.271 nucleotídeos) para parte do segmento codificante de VP1 de CAVS. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens. Método de substituição de nucleotídeos Kimura2. Legenda: Sequências obtidas da avicultura familiar (CAVAF) e industrial (CAVAI).

**Tabela 4.** Similaridade (em %) entre 1271 nucleotídeos das sequências obtidas neste estudo de CAV e de outras partes do mundo (GenBank).

	CAV 1221/ 2010	CAV 346/ 2005	CAV 740/ 2009	CAV 976/ 2010	CAV 584/ 2009	CAV 140/ 2008	CAV 841/ 2010	CAV 206/ 2008	CAV 263 /2006	CAV 1136/ 2006	CAV 632/ 2009	CAV 1013/ 2010	CAV 585/ 2009	CAV 1086/ 2010	CAV 15/ 2006	CAV 1029/ 2010	CAV 240/ 2008
Cuxhaven-1	94,9	95,4	95,4	95,0	97,1	95,7	94,9	95,0	97,7	97,0	97,7	95,3	97,4	95,0	97,7	95,4	95,4
26P4	95,0	95,2	95,2	95,1	97,2	95,6	94,8	94,8	97,8	97,3	97,8	95,0	97,8	94,6	97,8	95,6	95,8
CIA-1	95,2	95,6	95,7	95,3	97,2	95,9	95,0	95,2	97,2	97,5	97,5	95,5	97,9	95,2	97,2	95,8	96,1
ArgA001028	99,4	97,3	97,2	99,4	96,9	97,4	99,5	98,6	94,8	96,6	95,2	97,7	95,7	98,2	94,8	97,9	98,6
BD-3	94,9	95,8	95,9	95,0	97,1	96,0	94,9	95,2	97,3	97,7	97,3	95,5	98,2	95,4	97,3	95,8	95,9
CH_CK/04-01/GD/98	97,4	98,2	98,2	97,6	96,6	98,3	97,4	98,4	95,0	96,6	95,3	98,1	96,8	97,9	95,0	98,5	97,8
704	98,2	98,3	98,2	98,3	96,7	98,6	98,4	99,3	94,9	96,9	95,2	98,6	96,6	98,8	94,9	98,9	98,6
SMSC-1	97,8	97,9	97,8	97,9	96,3	98,2	98,0	98,9	94,3	96,5	94,6	98,2	96,2	98,4	94,5	98,5	98,2
3711	94,0	94,4	94,0	93,8	94,8	94,4	93,6	94,2	94,2	93,9	94,3	94,2	94,5	94,1	94,2	94,4	93,7
Lanlate.NIE/ 11.02/12	95,3	95,5	95,5	95,4	97,5	95,9	95,2	95,2	98,2	97,6	98,1	95,4	98,1	94,9	98,2	95,9	96,1
India	94,9	95,4	95,4	95,0	97,1	95,7	94,9	95,0	97,7	97,0	97,7	95,3	97,4	95,0	97,7	95,4	95,4
CAV-B	95,3	96,2	96,2	95,4	97,5	96,4	95,3	95,6	97,7	98,1	97,8	95,9	98,4	95,7	97,7	96,2	96,3
98D06073	97,3	98,2	98,2	97,3	96,2	98,3	97,3	98,2	94,8	96,3	95,0	98,0	96,3	97,8	94,8	98,4	97,4
Karnataka	94,6	94,8	94,8	94,7	97,1	95,0	94,4	94,2	98,1	96,4	98,2	94,8	97,2	94,5	98,1	95,0	95,0
SH16	95,2	95,2	95,2	95,3	97,2	95,4	95,0	94,8	98,3	96,8	98,4	95,2	97,6	94,8	98,3	95,4	95,4
ANAND	97,7	98,6	98,6	97,9	96,9	98,6	97,7	98,4	95,4	96,9	95,6	98,4	97,2	97,9	95,4	98,8	98,0
Del-Ros	95,1	95,3	95,4	95,2	97,4	95,5	94,9	94,9	98,1	97,2	98,2	95,3	98,2	94,9	98,1	95,5	95,7
Pallister	94,0	94,4	94,0	93,8	94,6	94,4	93,6	94,2	94,2	93,9	94,3	94,2	94,5	94,1	94,2	94,4	93,9
G-6	98,2	98,2	98,1	98,2	96,6	98,5	98,3	99,2	94,8	96,9	95,0	98,6	96,6	98,7	94,8	98,8	98,5
CH_CK/04-12/GD/7616	95,5	96,4	96,0	95,6	97,3	96,4	95,4	96,3	97,0	98,5	97,1	96,4	98,1	95,9	96,9	96,5	96,3

Da mesma maneira, Craig *et al.* (2009) analisaram filogeneticamente o genoma completo da VP1 de 18 isolados argentinos e, comparando com outras estirpes do GenBank, de forma similar aos genótipos classificados por He *et al.* (2007), observaram que as sequências também formaram 3 grupos genéticos. Os mesmo autores consideraram que todos os isolados argentinos se agruparam no genótipo B.

Na análise filogenética dos 423 aminoácidos deduzidos sequenciados da VP1 das 17 amostras deste estudo em comparação com as 20 estirpes do GenBank (Quadro 3), observou-se a formação de três clusters (Figura 5). As amostras deste estudo ficaram distribuídas em dois (I e III) dos três grupos genômicos e nenhuma ficou no mesmo grupo que as estirpes de CAV Cuxhaven-1 (vacina AviPro® Thymovac,

Lohmann Saúde Animal) e 26P4 (vacina Nobilis CAV P4, Intervet International, Holanda) usadas na produção de vacinas no Brasil.

Quadro 3. Relação das estirpes de CAV de referência.

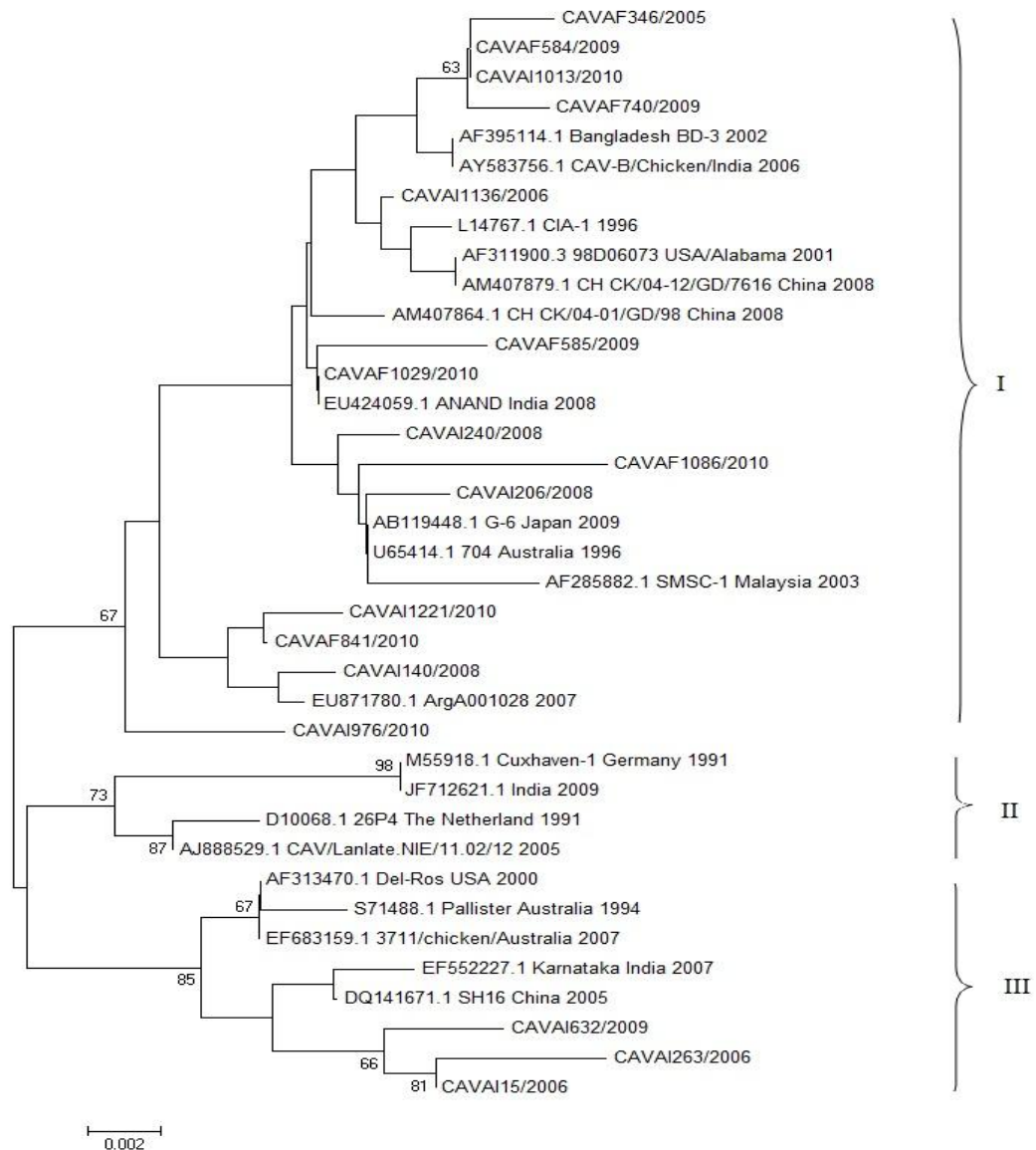
No. de acesso no GenBank	Isolado ou estirpe	Sequência disponível no Genbank	País	Ano Isolamento
D10068.1	26P4	Genoma completo	Holanda	1991
M55918.1	Cuxhaven-1	Genoma completo	Alemanha	1991
S71488.1	Pallister	Gene VP1	Austrália	1994
L14767	CIA-1	Genoma completo	EUA	1996
U65414.1	704	Genoma completo	Austrália	1996
AF313470	Del-Ros	Genoma completo	Delaware-EUA	2000
AF311900.3	98D06073	Genoma completo	Alabama EUA	2001
AF395114.1	BD-3	Genoma completo	Bangladesh	2002
AF285882.1	SMSC-1	Genoma completo	Malásia	2003
AJ888529.1	CAV/Lanlate.NIE/11.02/12	Gene VP1	Nigéria	2005
DQ141671.1	SH16	Genoma completo	China	2005
AY583756.1	CAV-B/Chicken/Índia	VP1, VP2, VP3 genoma parcial	Índia	2006
EU871780.1	ArgA001028	Gene VP1	Argentina	2007
EF683159.1	3711	Genoma completo	Austrália	2007
EF552227.1	Karnataka	Gene VP1	Índia	2007
AM407864.1	CH_CK/04-01/GD/98	Gene VP1	China	2008
AM407879.1	CH_CK/04-12/GD/7616	Gene VP1	China	2008
EU424059.1	ANAND	Genoma completo	Índia	2008
JF712621.1	Índia	Gene VP1	Índia	2009
AB119448.1	Gifu-6	Genoma completo	Japão	2009

\*Disponíveis no GenBank usadas nas árvores filogenéticas, respectivos números de acesso, sequência disponível no GenBank, país e o ano.

No primeiro grupo genômico obtido na análise filogenética (Figura 5) observa-se agrupamento da maioria das amostras deste estudo, com as estirpes do Sul da China de aves de mercados de aves vivas (Ducatez *et al.*, 2008). Também se agrupam com estirpes dos Estados Unidos, Índia, Austrália, Malásia e Japão. No terceiro grupo três sequências mineiras provenientes da avicultura industrial (frangos de corte) estão agrupadas com as estirpes de

Karnataka (Índia), SH16 (China), 3711 e a estirpe Pallister, ambas da Austrália, além da estirpe Del-Ros (EUA) a qual também está sendo atualmente usado no Brasil para a produção de vacinas contra CAV (Circomune®, Ceva). As sequências CAVAI632/2009, CAVAI263/2006, CAVAI15/2006 têm em comum o fato de serem provenientes de regiões próximas em Minas Gerais, com quadros de desuniformidade e desempenho ruim.





**Figura 5.** Arvore filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método *neighbor-joining* com as seqüências geradas neste estudo (423aa) de parte de VP1 de CAV da avicultura familiar e industrial de Minas Gerais e as obtidas do GenBank. Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens e o método de substituição de aminoácidos do JTT. Legenda: Sequências obtidas da avicultura familiar (CAVAF) e industrial (CAVAI); seqüências do GenBank (numero de acesso, nome seqüência, país, ano publicação).

A média da distância genética das 17 sequências deste estudo é de 3% para nucleotídeos e de 1,4% para aminoácidos, calculado com o modelo *neighbor-joining* para nucleotídeo, com o método Kimura-2, e com o método JTT para aminoácidos. Resultados aproximados foram calculados por Ducatez *et al.* (2008) que encontraram uma distância genética média de 2,5% para nucleotídeos e 1,4% para aminoácidos, em 112 sequências de várias partes do mundo. Entre 9 estirpes dos Estados Unidos os mesmos autores calcularam uma distância genética média de 2,9% para nucleotídeos e 1,7% para aminoácidos

Van Santen *et al.* (2001), consideraram a posição 22 como importante na determinação das diferentes estirpes de CAV. Neste estudo, observou-se que na maioria das sequências de avicultura de

subsistência, o resíduo Histidina (H) na posição 22. Nas estirpes da avicultura industrial observou-se Histidina (H) ou Asparagina (N) nesta mesma posição (Quadro 4). Estes dois aminoácidos são observados nesta posição em diferentes amostras de CAV e nas sequências disponibilizadas no GenBank. A sequência de CAV1029/2010 foi a única deste estudo a apresentar o resíduo Glutamina (Q) nesta posição. Esta amostra foi obtida de uma galinha da avicultura familiar e essa mesma substituição foi observada nas estirpes 98D06073\_USA (Alabama) e CH\_CK/04-01/GD/98 (China).

**Quadro 4.** Substituições de aminoácidos na proteína VP1 do CAV, verificadas nas sequencias de Minas Gerais e as obtidas do GenBank, utilizando como consenso estirpe Cuxhaven-1 (423aa).

Estirpes GenBank\Posição	22	75	97	98	125	139	144	197	254	287	290	370	376
Cuxhaven-1	H	V	M	Y	I	K	D	F	G	A	A	S	L
CAVAI1221/2010	N	I	L	*	*	*	E	L	E	T	*	*	*
CAVAI976/2010	*	I	L	*	*	*	E	*	E	T	*	R	I
CAVAI140/2008	N	I	L	*	*	*	E	*	E	T	P	T	*
CAVAI206/2008	*	I	L	*	*	Q	Q	L	E	T	P	*	*
CAVAI632/2009	N	*	I	F	L	*	E	*	E	S	*	G	I
CAVAI240/2008	N	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	P	*	*
CAVAI1013/201	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	S	*	T	*
CAVAI15/2006	*	*	*	F	L	*	E	*	E	S	*	G	I
CAVAI263/2006	*	*	*	F	L	*	E	*	E	S	*	G	I
CAVAI136/2006	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	*	*	*	*
CAVAF584/2009	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	S	*	T	*
CAVAF740/2009	*	I	L	*	*	Q	Q	W	E	S	*	T	*
CAVAF841/2010	N	I	L	*	*	*	E	*	E	T	*	*	*
CAVAF346/2005	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	S	*	T	*
CAVAF585/2009	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	*	*	*
CAVAF1086/2010	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	P	T	*
CAVAF1029/2010	Q	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	*	*	*
D10068.1_26P4_The_Netherland_1991	*	*	*	*	*	*	E	*	*	T	*	*	*
L14767.1_CIA-1_1996	N	I	L	*	*	Q	Q	*	E	*	*	*	*
EU871780.1_ArgA001028_2007	N	I	L	*	*	*	E	*	E	T	P	*	*
AJ888530.1_CAV/Lanlate_NIE/11.02/73_Nigeria_2005	*	*	*	*	*	Q	Q	*	E	*	*	*	*
AF395114.1_Bangladesh_BD-3_2002	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	*	*	T	*
AM407864.1_CH_CK/04-01/GD/98_China_2008	Q	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	*	*	*
U65414.1_704_Australia_1996	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	P	*	*
AF285882.1_SMSC-1_Malaysia_2003	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	P	*	*
EF683159.1_3711/chicken/Australia_2007	*	*	*	*	*	*	E	*	E	S	*	G	*
AJ888529.1_CAV/Lanlate.NIE/11.02/12_2005	*	*	*	*	*	*	E	*	*	T	*	*	*
JF712621.1_India_2009	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
AY583756.1_CAV-B/Chicken/India_2006	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	*	*	T	*
AF311900.3_98D06073_USA/Alabama_2001	Q	I	L	*	*	Q	Q	*	E	*	*	*	*
EF552227.1_Karnataka_India_2007	*	*	*	*	L	*	E	*	E	S	*	G	I
DQ141671.1_SH16_China_2005	*	*	*	*	L	*	E	*	E	S	*	G	*
EU424059.1_ANAND_India_2008	*	I	L	*	*	Q	Q	*	E	T	*	*	*
AF313470.1_Del-Ros_USA_2000	*	*	*	*	*	*	E	*	E	S	*	G	*
AB119448.1_G-6_Japan_2009	*	I	L	*	I	Q	Q	*	E	T	P	*	*

D: Acido Aspártico; E: Acido Glutâmico; A: Alanina; R: Arginina; N: Asparagina; F: Fenilalanina; G:Glicina; Q: Glutamina; H: Histidina; I: Isoleucina; L: Leucina; K: Lisina; M: Metionina; P: Prolina; S: Serina; Y: Tirosina; T: Treonina; W: Triptofano; V: Valina.

Estudos prévios reportaram uma região hipervariável na proteína VP1 entre os aminoácidos 139 e 151, com maior grau de variabilidade (Renshaw *et al.*, 1996; Van Santen *et al.*, 2001). Estes autores observaram que a presença de Glutamina nas posições 139 e 144 está relacionada com baixa replicação do vírus em cultivo celular, em comparação com a estirpe Cux-1. Van Santen *et al.* (2001), em estudo realizado em frangos de corte, propuseram que os aminoácidos das posições 139 e 144 estão relacionados, de forma que todas as vezes em que na posição 139 aparece Q (Glutamina), o mesmo aminoácido Q aparece na posição 144. Da mesma maneira, quando na posição 139 é encontrado o aminoácido K (Lisina), o aminoácido E (Ácido glutâmico) estará na posição 144. Resultados semelhantes foram verificados por Simionatto *et al.* (2006). No presente estudo observaram-se também as duas substituições nestas posições, nas sequências que corresponderam às aves de subsistência, observou-se na posição 139 e 144 Glutamina (Q) na maioria das amostras, exceto na amostra CAVAF841/2010, indicando possivelmente que estes CAVs teriam baixo crescimento em cultivos celulares. Nas amostras da avicultura industrial foi observado, na posição 139, o resíduo K ou Q, enquanto na posição 144 observou-se, respectivamente, E ou Q, concordando com a relação descrita por Van Santen *et al.* (2001).

Islam *et al.* (2002) identificaram resíduo de aminoácidos na posição 75I/T, 97L, 139Q, 144Q. Os autores concluíram que estas posições podem ser usadas para agrupar CAV em diferentes clusters. No presente trabalho, não foi possível observar essa relação na análise filogenética dos aminoácidos (Figura 5). Porém, nas aves de subsistência, em seis amostras, do total de sete, foram observados os resíduos 22H, 75I, 97L, 139Q, 144Q em comum, sendo

que estas sequências estão agrupadas no mesmo cluster. Wang *et al.* (2009) determinaram oito sítios ou aminoácidos os quais sofrem seleção positivas na VP1 pelo método Bayesiano empírico. Destes, quatro (75, 125, 141 e 144) são responsáveis pela atenuação do vírus, e o aminoácido 287 tem relação com a virulência de CAV, outras posições que também sofrem seleção positiva são a 139, 370 e 470. Os autores concluem que a seleção positiva ocorre sobre específicos aminoácidos do gene que codifica a proteína VP1. Em nosso estudo o maior número de substituições foi observado nos aminoácidos das posições 22, 75, 97, 125, 139, 144, 287, 370, a região do aminoácido da posição 470 não foi sequenciada neste estudo.

Em três estirpes de frangos de corte pertencentes ao mesmo grupo genético, procedentes da Zona da Mata e região metropolitana de Belo Horizonte, foi observada a substituição do aminoácido Y (Tirosina) pelo aminoácido F (Fenilalanina) na posição 98. Este mesmo resíduo foi descrito por Simionatto *et al.* (2006) como sendo específico de amostras brasileiras e estes autores observaram no histórico dos animais, sinais de imunodepressão (atrofia de órgãos linfoides), refugagem, desuniformidade e desempenho ruim do lote. Não observou-se esta substituição em outras estirpes de amostras disponíveis no GenBank, confirmando-se sua presença apenas em estirpes brasileiras. Todd *et al.* (2002) sugerem que a atenuação do CAV acontece quando ocorre a combinação da substituição dos aminoácidos 75I, 125L, 141L, 144E e o 89A e depois de múltiplas passagens em cultivos celulares. No presente estudo todas as estirpes apresentaram o resíduo Treonina (T) na posição 89, Glutamina (Q) na posição 141 e somente as obtidas de frangos de corte apresentaram o aminoácido Leucina (L) na posição 125. As sequências deste estudo foram obtidas diretamente de tecidos das

aves, por isso não é esperada a atenuação do vírus. Estes resultados condizem com os achados de Todd *et al.* (2002), quando afirma que somente a substituição do aminoácido Alanina por Treonina na posição 89 não é suficiente para produzir a atenuação do vírus como já havia sido observado anteriormente por Scott *et al.* (1999).

Todas as estirpes deste estudo mostraram o resíduo de Ácido Glutâmico (E) na posição 254, diferindo das estirpes usadas para produção de vacinas que mostram o aminoácido Glicina (G) nesta posição. Este resultado sugere que as estirpes vacinais de CAV em uso na atualidade parecem não ter tido papel importante na epidemiologia de CAV em Minas Gerais, destacando que as vacinas são usadas unicamente nas matrizes comerciais e não em frangos de corte, poedeiras e menos na avicultura familiar.

Na posição 290 observou-se a substituição do resíduo de Alanina (A) pelo aminoácido Prolina (P) nas três amostras provenientes de produção de frangos de corte identificadas como CAVAI140/2008; CAVAI206/2008 e CAVAI240/2008, e em uma sequência da avicultura familiar CAVAF1086/2010. Essa mesma substituição foi descrita em 18 amostras argentinas, por Craig *et al.* (2009) de casos clínicos de imunodepressão, como também nas estirpes da Malásia (SMSC-1) e na Austrália (704).

Na posição 370 observou-se a substituição do resíduo Serina (S) pela Glicina nas sequências obtidas de frango de corte (CAVAI632/2009; CAVAI15/2006; CAVAI263/2006). Essa mesma substituição foi detectada na estirpe Del-Ros dos EUA, 3711 da Austrália, SH16 da China, e da Índia Karnataka.

Na posição 376 foi substituído o aminoácido Leucina por Isoleucina, nas

amostras obtidas de frangos de corte (CAVAI976/2010; CAVAI632/2009; CAVAI15/2006 e CAVAI263/2006). Esta substituição é sinônima e foi observada também na estirpe da Índia (Karnataka).

Yamaguchi *et al.* (2001) definiram que o aminoácido na posição 394 pode ser o maior determinante da virulência de CAV. Se ocorre Glutamina (Q) nesta posição o isolado é altamente patogênico. Surpreendentemente, todas as estirpes vacinais possuem Glutamina na posição 394. Por outro lado, se ocorre Histidina (H), o isolado é menos patogênico. Todas as estirpes deste estudo têm Glutamina (Q) nesta posição, o que indicaria possivelmente que todas as amostras de Minas Gerais avaliadas são patogênicas.

Craig *et al.* (2009) caracterizaram filogeneticamente 18 amostras argentinas provenientes da avicultura industrial com sinais de imunodepressão e observaram que as estirpes argentinas mostraram distanciamento genético das estirpes vacinais usadas na avicultura nas análises filogenéticas. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo (Figuras 4).

Eltahir *et al.* (2011) afirmaram que a análise filogenética dos nucleotídeos e dos aminoácidos pode não corresponder devido à presença de mutações silenciosas. Tendo maior similaridade entre os aminoácidos dos isolados de CAV de varias partes do mundo, resultados semelhantes foram achados no presente estudo. Estes mesmos autores, estudando amostras chinesas provenientes de regiões distintas as agruparam em quatro grupos genômicos com alto *bootstrap*. No presente estudo as sequências mineiras se distribuíram em dois grupos distintos, com diversos subgrupos.

As sequências deste estudo mostraram similaridade de nucleotídeos de 93,6 a

99,5%, quando comparadas com 20 sequências de diferentes partes do mundo disponíveis no GenBank (Tabela 4). Estas mesmas sequências apresentaram identidade de aminoácidos 96,6 a 100% entre as amostras deste estudo e as disponíveis no GenBank. A maior variação nas amostras mineiras, quanto ao genoma que codifica a VP1, observou-se nos aminoácidos das posições 22, 75, 97, 98, 125, 139, 144, 287, 290, 370 e 376 (Quadro 5). A Tabela 2 mostra os valores de identidade encontrados quando as sequências deduzidas dos aminoácidos de CAV (423aa) deste estudo foram comparadas com as sequências do GenBank e a Tabela 3 quando comparadas entre si. As análises das sequências de aminoácidos mostraram valores de identidade mais elevados do que os valores encontrados para nucleotídeos, variando de 96,6 a 100% para aminoácidos, indicando alto grau de conservação.

A sequência BD-3 (Bangladesh) que foi obtida de um surto da doença infecciosa bursal com 50% de mortalidade em frangos (Islam *et al.*, 2002) e a sequência CAV-B (Índia) (Natesan *et al.*, 2006) mostraram alta identidade 99,8% com sequências deste estudo (CAVAF584/2009; CAVAI1136/2006 e CAVAI1013/2010) o que poderia indicar uma origem comum. As estirpes CAVAF584/2009 e CAVAI1136/2006, no histórico clínico, apresentaram sinais de imunodepressão, já a estirpe CAVAI1013/2010 foi obtida de aves sem sinais aparentes de doença.

As sequências CAVAI140/2008, CAVAF841/2010 da avicultura industrial e avicultura familiar respectivamente mostraram similaridade de 99,8% (aa deduzidos) com a estirpe argentina ArgA0001028, isolada de frangos com sinais clínicos da doença (Craig *et al.*, 2009).

A estirpe CAVAF1029/2010 apresentou identidade de aminoácidos deduzidos de 100% com a sequência CH\_CK/04-01/GD/98 (China), a qual foi obtida de galinhas de mercados de aves vivas.

A sequência G-6 (Japão) mostrou alta identidade de aminoácidos (99,8%) com o CAVAI206/2008 e CAVAI240/2008, ambas provenientes da avicultura industrial e coletadas de surtos da doença infecciosa bursal.

Quando comparadas as estirpes usadas na produção de vacinas com as amostras deste estudo, observou-se que a estirpe Del-Ros apresentou maior identidade (99%) que as estirpes Cuxhaven-1 e 26P4. No dendrograma baseado nos aminoácidos (Figura 5), observou-se que a estirpe Del-Ros está no mesmo grupo genético que as sequências CAVAI15/2006; CAVAI263/2006 e CAVAI632/2009. As estirpes Cuxhaven-1 e 26P4 localizam-se no grupo genético II e não se agruparam com nenhuma das amostras deste estudo (Figura 5).

## Conclusão

- Os iniciadores desenhados neste estudo podem ser úteis para o diagnóstico de CAV em amostras clínicas ou subclínicas com alta especificidade e sensibilidade.
- O CAV parece estar disseminado na avicultura industrial e familiar de Minas Gerais.
- As sequências deste estudo mostraram alta identidade com estirpes de vários lugares do mundo e se mostraram menos próximas quando comparadas com as estirpes vacinais usadas no Brasil. As análises filogenética dos nucleotídeos e aminoácidos das sequências deste

estudo, mostraram o agrupamento destas em dois grupos genéticos diferentes, dos três gerados com as sequências do GenBank.

- Neste estudo observou-se também o aminoácido F na posição 98 em três amostras provenientes da avicultura industrial, sendo que este aminoácido parece ser específico de estirpes brasileiras, pois não foi encontrado nas sequências de outras partes do mundo disponibilizadas no GenBank.

### Referências Bibliográficas

- BARRIOS, P. R., MARÍN, S. Y.; RESENDE, M. *et al.* Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciências Avícolas*, v.11, n.2, p.135-138, 2009.
- BARRIOS, P. R.; MARIN, S. Y. G.; RIOS, R.L. *et al.* A Retrospective PCR Investigation of Avian Orthoreovirus, Chicken Infectious Anemia and Fowl Aviadenovirus Genomes contamination in Commercial Poultry Vaccines in Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.64, n.1, p.231-235, 2012.
- BOOM, R.; SOL, C.; BELD, M. *et al.* Improved silica – guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha – casein to silica particles. *J. Clin. Microbiol.* v.37, p. 615 – 619, 1999.
- BRENTANO, L. Anemia infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J. *et al.* (Eds). *Doenças de aves*. 2. ed. Campinas: FACTA - Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009. p. 735-762.
- BRENTANO L.; LAZZARIN S.; BASSI S.S. *et al.* Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. *Vet. Microbiol.*, v.105, p. 65-72, 2005.
- BRENTANO L.; SILVA B. G.; SAYD S. *et al.* Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte do Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Avíc.*, v. 2 n.2, p. 157-179, 2000.
- BRENTANO, L.; MORES, N.; WENTZ, I. *et al.* Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Dis.*, v. 35, p. 793–800, 1991.
- CRAIG, M. I.; RIMONDI, A.; DELAMER, M. *et al.* Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007. *Avian Dis.* v.53, n.3, p. 331-335, 2009.
- DAVIDSON, I.; ARTZI, N.; SHKODA, I. *et al.* The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. *Virus Res.*, v.132, p. 152-159, 2008.
- DUCATEZ, M. F.; CHEN, H.; GUAN, Y. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus (CAV) in southeastern chinese live birds markets. *Avian Dis.*, v. 52, n.1, p. 68-73, 2008.
- DUCATEZ M. F.; OWOADE A. A.; ABIOLA J. O. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch. Virol.*, v.151, n.1, p. 97-111, 2006.
- ELTAHIR, Y. M.; QIAN, K; JIN W. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. *Virolog. J.*, v. 30, p.1-8, 2011.
- GOMES, F. R.; LOBATO, Z. I. P.; OLIVEIRA, D. D. *et al.* Chicken anemia

- virus: serology in broiler breeders and virus detection in the progeny. *Anais do 16º Encontro Nacional de Virologia*. Campos do Jordão, São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia (SBV), 2005, p. 22-25.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p. 95-98, 1999.
- HE, C. Q; DING, N. Z.; FAN, W. *et al.* Identification of chicken anemia virus putative intergenotype recombinants. *Viol.*, v. 366, n.1 p. 1-7, 2007.
- ISLAM, M. R.; JOHNE, R.; RAUE, R. *et al.* Sequence analysis of the full-length cloned DNA of chicken anaemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence of genetic grouping of CAV strains based on the deduced VP1 amino acid differences. *J. Vet. Med. B.* v.49, p. 332-337, 2002.
- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* v.16 p.111-120, 1980.
- JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS*, v.8, p. 275-282, 1992.
- NOGUEIRA E. O.; FERREIRA, P. A.; SOARES, M. R. *et al.* Genome sequencing analysis of Brazilian chicken anemia virus isolates that lack MSB-1 cell culture tropism. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.*, v.30, n.2, p.81-96, 2007.
- MCNULTY, M.S.; MCILROY, S.G.; BRUCE, D.W. *et al.* Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 35, p. 263 – 268, 1991.
- MEEHAN, B. M.; TODD, D.; CREELAN, J. L. *et al.* Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch. Virol.* v.124; p. 301-319, 1992.
- OLUWAYELU, D.O.; TODD, D. Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis. *Afr. J. Biotechnol.* v.7, n.3, p. 271-275, 2008.
- RENSHAW, R. W; SOINE, C; WEINKLE, T. *et al.* A hypervariable region in VP1 of chicken anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J. Virol.* v.70, p.8872–8878, 1996.
- ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.*, v. 21, p. 173-174, 1993.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. J. “Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers”. *Methods Mol. Biol.*, v.132, p.365-386, 2000.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS. USA*, v.74, p. 5463-5467, 1997.
- SCHAT, K.A; VAN SANTEN, V. Chicken anemia virus. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R. *et al.* (Eds.), *Diseases of Poultry*. 12 ed. Ames: Wiley-Blackwell, p. 211-235, 2008.
- SCOTT, A. N. J.; CONNOR, T. J.; CREELAN, J. L. *et al.* Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anaemia virus isolates obtained after multiple cell culture



passages. *Arch. Virol.*, v. 144, p. 1961-1975, 1999.

SIMIONATTO, S.; LIMA-ROSA, C.A.; BINNECK, E. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anaemia virus. *Virus Gen.*, v. 33, p. 5-10, 2006.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, v.28, n.10, p. 2731-2739, 2011.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK F. *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, n. 24, p. 4876-4882, 1997.

TODD, D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet. Microbiol.*, v.98, p.169–174, 2004.

TODD, D.; CREELAN, J. L.; CONNOR, T. *et al.* Investigation of the unstable attenuation exhibited by a chicken anaemia virus isolate. *Avian Pathol.*, v. 32, n.4, p.375-382, 2003.

TODD, D.; SCOTT, A. N. J.; BALL, N. W.; *et al.* Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anaemia virus isolates. *J. Virol.*, v. 76, n. 16, p. 8472-8474, 2002.

TODD, D.; MAWHINNEY, K.A.; MCNULTY, M.S. Detection and differentiation of chicken anaemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, n.30, p. 1661-1666, 1992.

TORO, H.; EWALD, S.; HOERRAC, F.J.. Serological Evidence of Chicken Infectious

Anemia Virus in the United States at Least Since 1959. *Avian Dis.* v. 50, p. 124–126, 2006.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). Avicultura Brasileira em 2010: Estatística. Disponível em: <[www.ubabef.com.br/](http://www.ubabef.com.br/)> (Acesso em, 28 de fevereiro de 2011).

VAN SANTEN, V.L.; LI, L; HOERR F.J. *et al.* Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama, *Avian Dis.*, v. 45, p. 373–388, 2001.

VIRUS TAXONOMY. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: [www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org). Acessado em:18/10/2011

WANG, D.; FAN, W.; HAN, G. Z. *et al.* The selection pressure analysis of chicken anemia virus structural protein gene VP1. *Virus Genes.* v.38 n.2, p. 259-62, 2009.

YAMAGUCHI, S.; IMADA, T.; KAJI, N. *et al.* Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J. General Virol.*, n. 82 p. 1233–1238, 2001.

## **CAPITULO V - CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS CONTAMINANTE DE VACINAS COMERCIAIS PRODUZIDAS NA DÉCADA DE 90**

### **Resumo**

O genoma do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV) foi detectado em estudo anterior por nested-PCR como contaminante em sete vacinas comerciais produzidas na década de 90 em ovos embrionados e cultivos celulares de fibroblastos de embriões de galinhas SPF. Com o objetivo de caracterizar filogeneticamente o genoma do CAV e comparar com isolados brasileiros e de outras partes do mundo, foram sequenciadas três das sete amostras positivas, gerando uma sequência de aproximadamente 675pb do gene que codifica a região hipervariável da proteína VP1 do CAV. O genoma de CAV detectado nas vacinas contaminadas mostrou alta similaridade (>98%) com as estirpes brasileira BR91/99 e argentina ArgA001028 (>99%). A comparação com as estirpes vacinais disponíveis no Brasil revelou similaridade de 97% com a estirpe Cuxhaven-1 e de aproximadamente 98% de identidade com a estirpe CAV26P4. A identidade entre as amostras posicionou as amostras deste estudo no mesmo grupo genético (clusters) com a estirpe brasileira BR91/99 e argentina ArgA001028. Este resultado pode ser indicador de que a contaminação de vacinas vivas pelo CAV, favoreceu a disseminação do vírus na avicultura industrial brasileira.

### **Introdução**

O vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV), descrito pela primeira vez por Yuasa *et al.* (1979) no Japão, produz uma doença imunodepressora, que junto com o vírus da Doença Infecciosa Bursal (DIB), representam as principais causas de imunodepressão de importância econômica, ocasionadas por vírus na produção avícola industrial. O vírus tem transmissão vertical e horizontal (Chettle *et al.*, 1989), sendo a transmissão vertical de grande importância na disseminação e perpetuação do vírus (Hoop, 1993). Cardona *et al.* (2000) detectou o genoma do CAV nos tecidos das gônadas de aves SPF. Schat e Schukken (2010) comprovaram a presença de anticorpos contra CAV em duas linhagens de galinhas SPF monitoradas durante oito anos e alerta para a persistência do vírus latente nestas aves. Hoop (1993) comprovou que a infecção do embrião também pode ser causada pelo sêmen de

machos infectados. Brentano *et al.* (2005) detectaram o genoma nas gônadas de aves com altos títulos de anticorpos e nos embriões oriundos destas matrizes. A transmissão vertical do CAV em lotes destinados à produção de imunobiológicos pode ter garantido por muitos anos a disseminação do mesmo via iatrogênica por meio de vacinas contaminadas, na avicultura industrial (Barrios *et al.*, 2012).

Muitas vacinas utilizadas na indústria avícola são produzidas em ovos embrionados ou células derivadas destes, embora sempre com a preocupação de serem usados embriões livres de patógenos específicos (SPF). Entretanto, o conhecimento do vírus da anemia infecciosa das galinhas e a preocupação por produzir lotes de aves SPF livres do CAV são relativamente recentes.

O vírus da anemia infecciosa das galinhas não é envelopado, tem simetria icosaédrica

de aproximadamente 25nm de diâmetro, e pertencente ao gênero *Gyrovirus* e família Circoviridae (ICTV, 2006). O genoma do vírus consiste de três fragmentos abertos de leitura (ORFs) ou proteínas virais, a VP1 que compõe a cápside viral, VP2 com atividade fosfatase e a VP3 com atividade apoptótica em células infectadas. A proteína VP3 do CAV, realizando apoptose, exerce importante função na patogenia do vírus. As proteínas VP1 e VP2 são os principais alvos dos anticorpos neutralizantes (Noteborn *et al.*, 1998). O gene da VP1 é o mais variável e, embora o genoma do CAV seja altamente conservado, comparações entre sequências da proteína VP1 de diferentes partes do mundo, descreveram a presença de uma região hipervariável compreendida entre os aminoácidos 139 e 151. Renshaw *et al.* (1996) demonstraram que os aminoácidos na posição 139 e 144 têm um papel vital na replicação e disseminação do vírus em cultivos celulares.

Segundo Amer *et al.* (2011) a PCR é o melhor método para detectar agentes infecciosos e contaminantes em vacinas comerciais, por ser um método altamente sensível, rápido e de fácil execução.

O objetivo deste trabalho foi a detecção e caracterização do vírus da anemia em vacinas comerciais, por nested-PCR e

sequenciamento genético, para estabelecer relações filogenéticas entre os genomas do CAV contaminante das vacinas comerciais e sequências de estirpes selecionadas do CAV depositadas no GenBank, originárias do Brasil e de outras partes do mundo.

## **Material e Métodos**

Foram utilizadas 38 vacinas comerciais vivas atenuadas de diversas especificidades, e duas inativadas produzidas pelos principais laboratórios produtores (denominados A, B, C, D, F, G, H), para avicultura industrial no Brasil (Quadro 1), para a detecção do DNA de CAV. As vacinas estavam liofilizadas, lacradas e foram reconstituídas com 2mL água milliQ estéril para extração do DNA.

## **Extração e amplificação do DNA**

O ácido nucleico das vacinas foi extraído usando o método de sílica com Iodeto de sódio (6M), seguindo o protocolo previamente descrito por Boom *et al.* (1990) com modificações. A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoVue® (GE, Healthcare, Reino Unido).

**Quadro 1.** Vacinas aviárias comerciais de vírus vivo ou inativado utilizadas no presente estudo para detecção de parte do genoma do CAV (VP1).

No.	Data de Fabricação	Vacina (Enfermidade)	Estirpe vacinal	Laboratório
1	jan/91	Newcastle (NC)	La sota B1	A
2	set/91	Bouba	Poxvírus de Galinha, amostra forte	A
3	dez/91	Bronquite	Massachusetts H-52	B
4	mar/92	Newcastle	La Sota B1	A
5	mai/92	Newcastle	La Sota B1	A
6	dez/92	Bronquite	Massachusetts H-52	C
7	jan/94	Encefalomielite	Calnek 1010	A
8	jan/95	Bronquite	Massachusetts H-52	D
9	jan/95	Bouba	Poxvírus de Galinha, amostra forte	A
10	fev/96	Marek	HVT-FC 126	C
11	jul/96	Marek	HVT-FC 126	B
12	set/97	Bronquites	Massachusetts H-120	C
13	jan/98	Newcastle	La Sota B1	C
14	set/98	Bronquite	Massachusetts H-90	C
15	nov/98	Doença infecciosa bursal	S-706	C
16	dez/98	Doença infecciosa bursal	Estirpe Lukert (intermediária)	C
17	dez/98	Bronquite	Massachusetts H-120	C
18	set/01	Bronquite	Massachusetts H-90	E
19	Set/01	Bronquite	Massachusetts MA5	C
20	fev/02	Bronquite	Massachusetts H-120	F
21	abr/04	Doença infecciosa bursal	Lukert (amostra intermediária)	C
22	mai/04	*EDS-76	Inativada	B
23	jun/04	Newcastle	La Sota B1	B
24	jul/04	Doença infecciosa bursal	Amostra intermediária GBV-8	B
25	jul/04	Newcastle	La Sota	B
26	ago/04	Bronquite	Massachusetts H-120	B
27	nov/04	Newcastle	La Sota B1	F
28	mar/05	Bronquite	Cepa Massachusetts H-120	F
29	mai/05	Encefalomielite	Calnek 1010	B
30	mai/05	Bronquite	Cepa Massachusetts H-120	F
31	jun/05	Newcastle	La Sota B1	G
32	ago/05	Newcastle	La Sota B1	F
33	ago/05	Bouba e Encefalomielite	Poxvírus de galinha, amostra forte e a estirpe Calnek 67	H
34	set/05	*BIG, NC, EDS-7, Coriza	Cepa 22L e H18	F
35	jan/06	Encefalomielite	Calnek 1010	H
36	mar/06	Encefalomielite	Calnek 1010	H
37	mai/06	Bronquite	Cepa Massachusetts H-120	H
38	abr/06	Bouba aviaria	Amostra suave tipo galinha	H
39	out/06	Marek	Herpesvirus de peru (HVT), Sorotipo 3, cepa FC-126, e HVT sorotipo 1, cepa Rispens	H
40	set/08	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>	MG-70	B

Legenda \*vacinas oleosas inativadas.

Para a detecção do CAV nas vacinas foi utilizada uma nested-PCR descrita previamente (Cardona *et al.*, 2000) (Quadro 2). Foram usados os iniciadores externos: O3F: 5'-(CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG)-3' e O3R: 3'-(TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT)-5' e iniciadores internos: N3: 5'-(CCA CCC GGA CCA TCA AC)-3' e N4: 3'-(GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C)-5', respectivamente na primeira e segunda reações. Na primeira reação, com volume final de 50µl foram utilizados: 200ng de DNA, Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de cada iniciador externo a 10pmol, 2U de Taq Polimerase (Taq DNA Polymerase – Phoneutria, Brasil) e água ultra pura q.s.p. As condições de amplificação foram um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos (min), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 45°C por 2 min e extensão a 72°C por 1 min, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos, em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA, EUA).

A segunda reação (*nested*-PCR) foi realizada em um volume final de 50µl, sendo utilizado como molde 1µl do produto amplificado da primeira reação e 1µl de cada iniciador interno a 10pmol. Os demais reagentes e as concentrações utilizadas foram as mesmas descritas para a primeira reação, assim como o programa de

amplificação. Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo o DNA extraído da vacina comercial AviPro Thymovac® (Lohman Animal Health, Brasil).

### Sequenciamento da região hipervariável do gene VP1

Para o sequenciamento foi amplificada uma região do genoma que codifica a proteína VP1 do CAV, com primers previamente descritos (Todd *et al.*, 1992), CAV1F 5' GACTGTTAAGATGGCAAGACGAGCT 3' e CAV2F 5' GGCTGAAGGATCCCTCCATTC 3' (Tabela 2). Na reação de amplificação, foram utilizados 300ng de DNA, Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µL de cada iniciador externo a 10pmol, 1U de Taq Polimerase (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p 50µL. O programa de amplificação. A PCR foi feita em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA, EUA), nas seguintes condições de temperatura: uma fase inicial a 94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de 94°C por 30 seg, 50°C por 60 seg e 72°C por 90 seg, com uma fase de extensão final de 72°C por 10 min.

**Quadro 2.** Iniciadores para detecção e sequenciamento do CAV.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene	Localização no genoma	Sentido	Segmento (pb)	Autores
O3F	CAAGTAATTCAAATGAACG	VP2 e VP3	462-481	+	387	Cardona <i>et al.</i> , 2000
O3R	TTGCCATCTTACAGTCTTAT		829-848	-		
N3	CCA CCC GGA CCA TCA AC		526-541	+	183	
N4	GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C		687-708	-		
CAV1	GACTGTAAAGATGGCAAGACGAGCT	VP1	833-856	+	675	Todd <i>et al.</i> , 1992
CAV2	GGCTGAAGGATCCCTCCATTC	VP1	1489-1508	-		

Posição descrita em base na sequência Cuxhaven-1 (Número de acesso no GenBank M55918.1 )

### **Análise dos produtos amplificados pelos ensaios de PCR**

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo (10mg/ml). A eletroforese ocorreu a 100V em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

### **Purificação dos produtos da PCR para sequenciamento com PEG**

Todos os produtos utilizados para sequenciamento mostraram banda única, não sendo necessária a extração do gel para o sequenciamento, sendo o amplicom purificado diretamente. Para a purificação do produto da PCR foi usado o método descrito por Rosenthal *et al* (1993) com modificações.

### **Sequenciamento genético**

Os produtos amplificados e purificados foram submetidos a um processo de sequenciamento pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et al.* (1997), utilizando o kit Big Dye Terminator Mix (*Applied Biosystems*, EUA), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Aproximadamente 1 µL do produto de PCR foi utilizado em cada reação de sequenciamento, adicionando 1 µL de cada iniciador na concentração de 10 pmol F e R, 1 µL de Big Dye, 1,5 µL de tampão Save Money (*Applied Biosystems*, EUA) e água

milliΩQ em q.s.p. 10 µL. Esta reação de sequenciamento foi feita em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc., EUA), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento do iniciador a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos, sendo esse ciclo repetido por 30 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando Isopropanol e etanol e homogeneizado em formamida Hi-Di™, sendo então feita a desnaturação rápida a 95°C por 2 minutos e colocado no gelo imediatamente.

Os produtos de sequenciamento foram analisados em um sequenciador automático por eletroforese capilar (ABI Prism 310 Genetic Analyser, Perkin Elmer), no laboratório de Genética do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e as seqüências geradas foram analisadas com programas específicos.

### **Análise das Sequências**

Todas as seqüências finais geradas foram comparadas com seqüências disponíveis no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os algoritmos dos programas BLAST 2.0 (Basic Local Alignment Search Tool), BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), desenvolvidos pelo NCBI, foram utilizados para a busca de similaridade entre os nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (Altschul *et al.*, 1997).

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-

senso, foi utilizado o programa BioEdit (Hall, 1999). Este programa permitiu editar e excluir as ambiguidades, quando necessário. Todas as sequências finais geradas foram comparadas com sequências disponíveis no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram alinhadas com 24 sequências de CAV depositadas no GenBank com o auxílio do programa Clustal X (Thompson *et al.*, 1997), implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* MEGA versão 5.0 para *Windows* (Tamura, *et al.*, 2011).

### Análises filogenéticas

A análise filogenética dos nucleotídeos e dos aminoácidos do gene VP1 foi feita usando o método *Neighbor-joining*, com o programa MEGA 5.0. Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança em topologia (*Bootstrap*) com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas. Com o método de substituição de nucleotídeos Kimura 2-parâmetro (Kimura, 1980) e o método de

substituição de aminoácidos JTT (Jones *et al.*, 1992).

### Resultados e Discussão

Das 40 vacinas avaliadas neste estudo (Quadro 1) parte do genoma de CAV foi detectado em sete vacinas da década de 90 (Quadro 3), pertencentes a diferentes laboratórios. Das sete vacinas positivas três foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente (Quadro 4).

**Quadro 3.** Vacinas contaminadas com o genoma de CAV

Data de Fabricação	Vacina	Laboratório
jan/91	Newcastle (NC)	A
mar/92	Newcastle	A
mai/92	Newcastle	A
jan/94	Encefalomielite	A
fev/96	Marek	C
jul/96	Marek	B
jan/98	Newcastle	C

**Quadro 4.** Vacinas aviárias vivas positivas para parte do genoma do CAV e usadas no sequenciamento.

Identificação sequência	Vacina	Partida	Data
CAV258/1991	Doença de Newcastle	003/91	1991
CAVY1/1994	Encefalomielite aviária	001/94	1994
CAV1315/1996	Doença de Marek	425/96	1996

Os produtos da PCR usando os iniciadores descritos por Todd *et al.* (1992) geraram uma sequência de aproximadamente 675pb do gene que codifica a região hipervariável da proteína VP1 (833-1508nt). Demonstrou-se alta qualidade dos eletroferogramas das três amostras sequenciadas e não se observaram inserções nem deleções nestas sequências. Na busca da

similaridade das sequências obtidas em comparação com sequências disponibilizadas no GenBank, encontrou-se identidade unicamente com estirpes de CAV.

Para a construção das árvores filogenéticas (Figuras 1 e 2) foram escolhidas 24 sequências disponibilizadas no Genbank de sequências de CAV do Brasil e de outras partes do mundo (Quadro 5). Na análise dos nucleotídeos, as estirpes brasileira BR91/99 (AY739210.1) e argentina ArgA001028 (EU871780.1) e as sequências deste estudo apresentaram alta similaridade (>99%). Entre as três sequências de CAV usadas neste estudo, a similaridade também foi >99%. O CAV é um vírus relativamente conservado e a similaridade dos nucleotídeos das estirpes deste estudo com estirpes utilizadas para a produção de vacinas contra CAV no Brasil foi de aproximadamente 95%. É importante destacar que as sequências deste estudo no agrupamento filogenético ficaram em um grupo genético diferente destas estirpes vacinais (Figuras 1). A sequência ArgA001028 (Argentina) foi obtida de lotes de frangos de corte com 28 dias de idade que apresentaram incremento na mortalidade e atrofia de órgãos linfóides (Craig *et al.*, 2009). A sequência BR91/99 (Brasil) foi isolada em 1999 de lotes de frangos de corte de duas a seis semanas de vida com lesões de anemia, palidez de medula óssea, atrofia de timo e com baixo desempenho produtivo (Nogueira *et al.*, 2007).

Na análise filogenética dos aminoácidos deduzidos (Quadro 5) das sequências deste estudo e sua relação com as disponíveis no GenBank, observou-se maior identidade das seguintes sequências CAVY1/1994 (JX415530.1); CAV258/1991 (JX415531.1) e CAV1315/1996 (JX415529.1) (99,1, 100 e 99,5%, respectivamente) com a ArgA001028 (Argentina) e de 98,9, 100 e 99,5 respectivamente, com a sequência BR91/99 (Brasil). Com outras sequências brasileiras a identidade foi maior a 97%. A identidade com estirpes usadas na produção de vacinas contra CAV no Brasil foi para Cux-1 entre 97,3 e 97,7% e para 26P4 de 97,7 e 98,2% (Tabela 1).

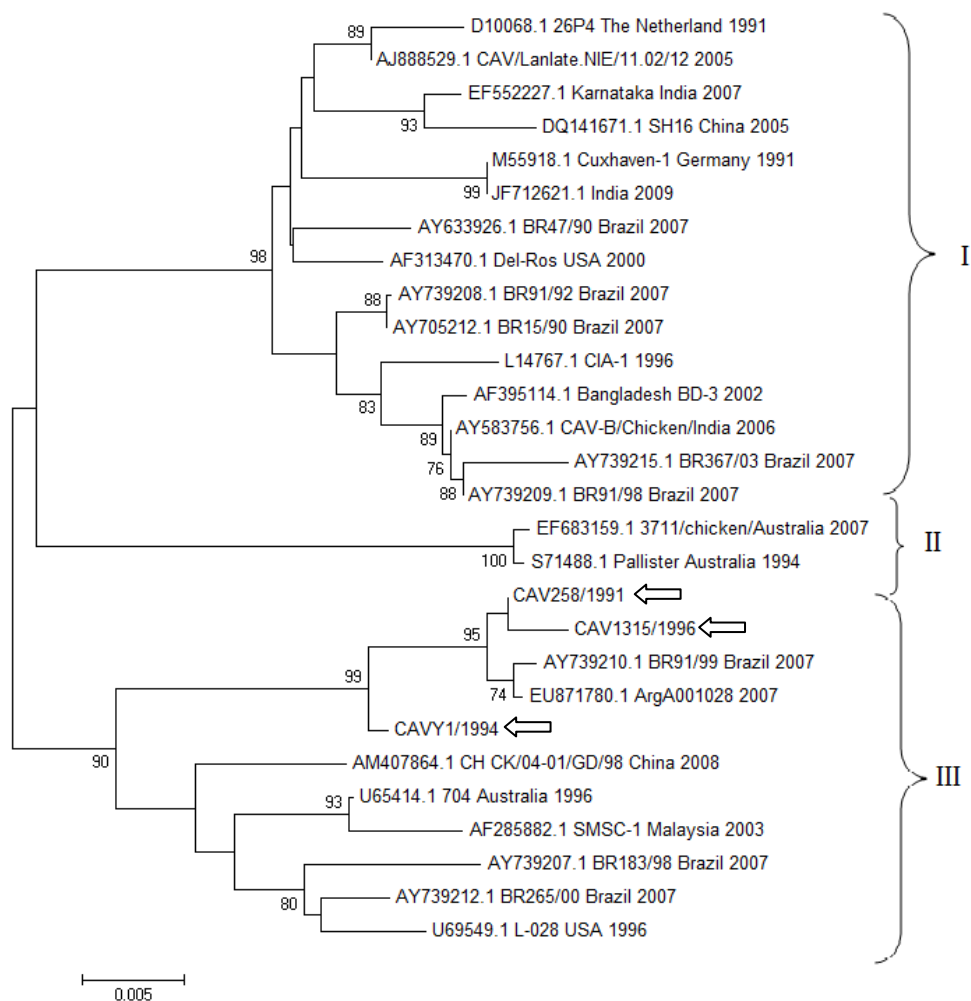
Todas as estirpes de CAV contaminante de vacinas tiveram o aminoácido Lisina (K) na posição 139 e o Ácido Glutâmico (E) na posição 144. Uma substituição antes não descrita foi observada nas estirpes CAVY1/1994 e CAV1315/1996 na posição 153. Foi substituído o resíduo Leucina (L) pelo Isoleucina (I) sendo esta substituição sinônima, neutra, não alterando provavelmente a função da proteína (Quadro 5). Estudos prévios reportaram a região hipervariável na proteína VP1 entre os aminoácidos 139 e 151, como a região com maior grau de variabilidade (Renshaw *et al.*, 1996). Estes autores relataram que a presença de glutamina (Q) na posição 139 e 144 está relacionada ao baixo crescimento em cultivo celular comparado com a estirpe Cux-1.

Determinou-se neste estudo alta identidade de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos entre as sequências de CAV contaminante nas vacinas comercializadas dos anos de 1991, 1994 e 1996 (contra a doença de Marek, Newcastle e Encefalomielite Aviária) e as estirpes brasileira BR91/99 e Argentina ArgA001028, o que indicaria um origem comum entre os vírus detectados nas vacinas e os descritos no Brasil e Argentina.

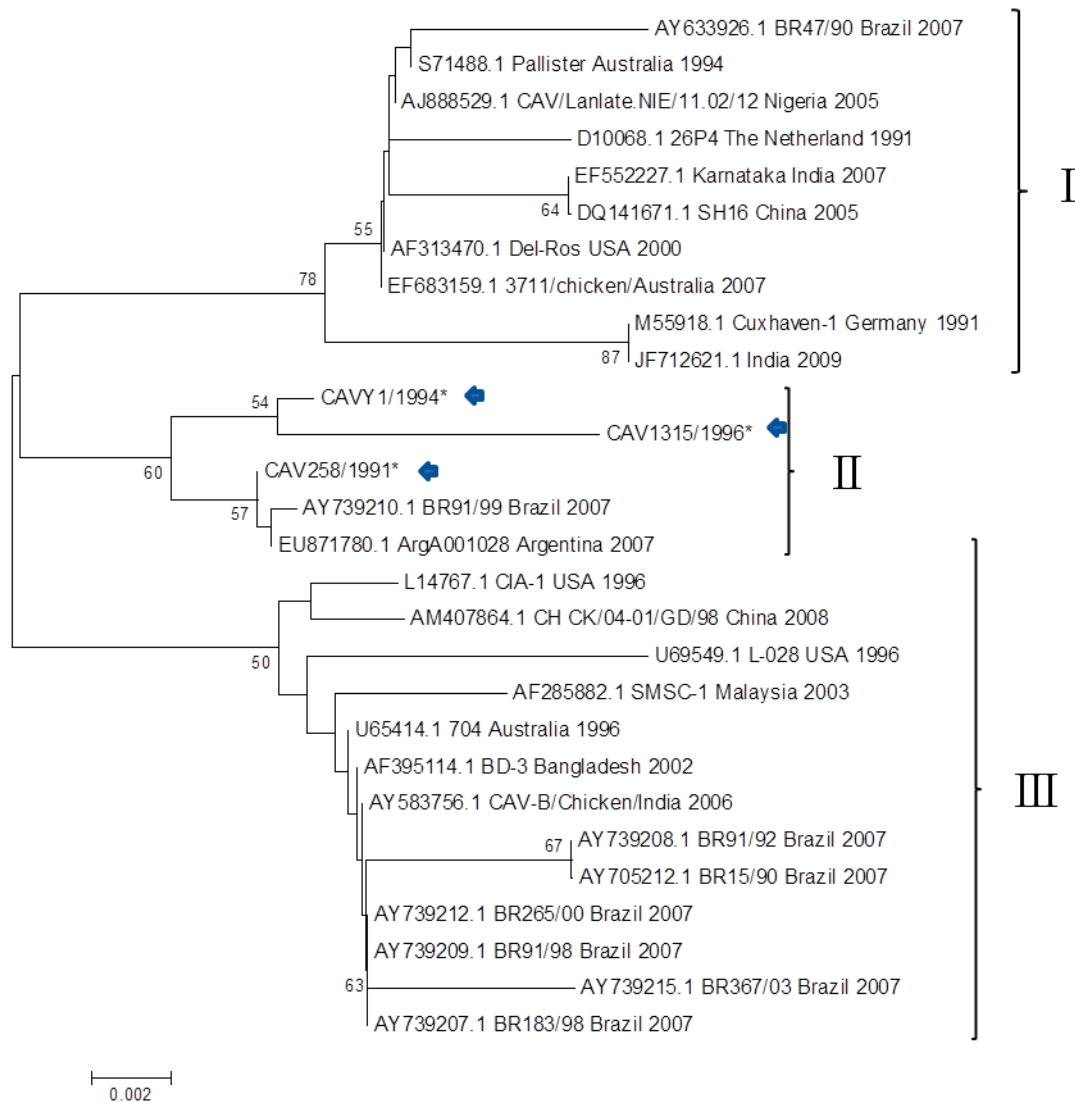


**Quadro 5.** Substituição de aminoácidos na região hipervariável da proteína VP1 (225aa) de estirpes de CAV detectadas como contaminante de vacinas com sequências deduzidas e as disponíveis no GenBank usando a estirpe Cux-1 como consenso.

Estirpe ou Isolado CAV/ Posição	22	75	97	139	144	153
Cuxhaven-1	H	V	M	K	D	L
JX415530.1 CAVY1/1994*	*	I	L	*	E	I
JX415531.1 CAV258/1991*	N	I	L	*	E	*
JX415529.1 CAV1315/1996*	N	I	L	*	E	I
D10068.1_26P4_The_Netherlands_1991	*	*	*	*	E	*
AY739215.1 BR367/03 Brazil 2007	*	I	L	Q	Q	*
AY739209.1 BR91/98 Brazil 2007	*	I	L	Q	Q	*
AY739208.1 BR91/92 Brazil 2007	*	I	*	Q	Q	*
AY633926.1 BR47/90 Brazil 2007	*	*	*	*	E	*
AY705212.1 BR15/90 Brazil 2007	*	I	L	Q	Q	*
AY739212.1 BR265/00 Brazil 2007	*	I	L	Q	Q	*
AY739211.1 BR303/99 Brazil 2007	*	I	L	Q	Q	*
AY739210.1 BR91/99 Brazil 2007	N	I	L	*	E	*
AY739207.1 BR183/98 Brazil 2007	*	I	L	Q	Q	*
L14767.1_CIA-1_1996	N	I	L	Q	Q	*
EU871780.1_ArgA001028_2007	N	I	L	*	E	*
AJ888530.1_CAV/Lanlate.NIE/11.02/73_Nigeria_2005	*	-	*	Q	Q	*
AF395114.1_Bangladesh_BD-3_2002	*	I	L	Q	Q	*
AM407864.1_CH_CK/04-01/GD/98_China_2008	Q	I	L	Q	Q	*
U65414.1_704_Australia_1996	*	I	L	Q	Q	*
AF285882.1_SMSC-1_Malaysia_2003	*	I	L	Q	Q	*
EF683159.1_3711/chicken/Australia_2007	*	*	*	*	E	*
AJ888529.1_CAV/Lanlate.NIE/11.02/12_2005	*	*	*	*	E	*
JF712621.1_India_2009	*	*	*	*	*	*
AY583756.1_CAV-B/Chicken/India_2006	*	I	L	Q	Q	*
U69549.1_L-028_USA_1996	*	T	L	Q	Q	*
AF311900.3_98D06073_USA/Alabama_2001	Q	I	L	Q	Q	*
EF552227.1_Karnataka_India_2007	*	*	*	*	E	*
DQ141671.1_SH16_China_2005	*	*	*	*	E	*
AF313470.1_Del-Ros_USA_2000	*	*	*	*	E	*



**Figura 1.** Arvore filogenética reconstruída no programa MEGA 5.0 pelo método *neighbor-joining* com as sequências dos CAVs contaminantes de vacinas e as sequências disponíveis no GenBank da região hipervariável do CAV (675 nucleotídeos). Dados submetidos ao teste de confiança em topologia (Bootstrap) com 1000 reamostragens. Método de substituição de nucleotídeos Kimura-2. Legenda: Sequências deste estudo marcadas com seta e amostras do GenBank (No. de acesso, País, ano de publicação).



**Figura 2.** Arvore filogenética das estirpes de CAV contaminante de vacinas comerciais, amostras brasileiras e de outras partes do mundo disponíveis no GenBank com base no segmento de 225 aminoácidos da região hipervariável da VP1. O dendrograma foi construído pelo método de “Neighbor-joining”, usando o modelo de substituição de aminoácidos do JTT implementados no programa MEGA 5.0. Os valores de reprodutibilidade das análises estão mostrados em porcentagens e são referentes a 1000 repetições (Bootstrap). As amostras deste estudo estão marcadas com seta.

**Quadro 6.** Relação das estirpes de CAV disponíveis no GenBank usadas nas análises por instrumentos de bioinformática neste estudo.

<b>No. de acesso no GenBank</b>	<b>Isolado ou estirpe</b>	<b>Sequência disponível no Genbank</b>	<b>País</b>	<b>Ano de isolamento</b>
<b>M55918.1</b>	Cuxhaven-1	Genoma completo	Alemanha	1991
<b>AY739215.1</b>	BR367/03	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	2003
<b>AY739209.1</b>	BR91/98	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	1998
<b>AY739208.1</b>	BR91/92	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	1992
<b>AY633926.1</b>	BR47/90	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	1990
<b>AY705212.1</b>	BR15/90	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	1990
<b>AY739212.1</b>	BR265/00	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	2000
<b>AY739210.1</b>	BR91/99	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	1999
<b>AY739207.1</b>	BR183/98	VP1, VP2 e VP3 genoma parcial	Brasil	1998
<b>D10068.1</b>	26P4	Genoma completo	Holanda	1991
<b>L14767</b>	CIA-1	Genoma completo	EUA	1996
<b>EU871780.1</b>	ArgA001028	Gene VP1	Argentina	2007
<b>AF395114.1</b>	BD-3	Genoma completo	Bangladesh	2002
<b>AM407864.1</b>	CH_CK/04-01/GD/98	Gene VP1	China	2008
<b>U65414.1</b>	704	Genoma completo	Austrália	1996
<b>AF285882.1</b>	SMSC-1	Genoma completo	Malásia	2003
<b>EF683159.1</b>	3711	Genoma completo	Austrália	2007
<b>AJ888529.1</b>	CAV/Lanlate.NIE/11.02/12	Gene VP1	Nigéria	2005
<b>AY583756.1</b>	CAV-B/Chicken/Índia	VP1, VP2, VP3 genoma parcial	Índia	2006
<b>JF712621.1</b>	Índia	Gene VP1	Índia	2009
<b>U69549.1</b>	L-028	Gene VP1	EUA	1996
<b>EF552227.1</b>	Karnataka	Gene VP1	Índia	2007
<b>DQ141671.1</b>	SH16	Genoma completo	China	2005
<b>AF313470</b>	Del-Ros	Genoma completo	Delaware- EUA	2000
<b>S71488.1</b>	Pallister	Gene VP1	Austrália	1994

\*Número de acesso, identificação estirpe, genoma disponível país e ano de publicação.

**Tabela 1.** Identidade dos nucleotídeos (nt) e aminoácidos (aa) das sequências de CAV contaminante de vacinas comerciais (\*), estirpes brasileiras e de outras partes do mundo disponíveis no GenBank.

	CAVY1/1994*		CAV258/1991*		CAV1315/1996*	
	nt	aa	nt	aa	nt	aa
<b>CUX-1</b>	95,9	97,7	95,2	97,7	94,9	96,8
<b>BR367/03</b>	95,2	97,9	94,4	97,9	94,1	96,8
<b>BR91/98</b>	95,7	98,4	95,0	98,4	94,6	97,3
<b>BR91/92</b>	96,3	97,9	95,6	97,9	95,2	96,8
<b>BR47/90</b>	96,3	97,9	95,6	97,9	95,2	96,8
<b>BR15/90</b>	96,3	97,9	95,6	97,9	95,2	96,8
<b>BR265/00</b>	97,4	98,4	97,0	98,4	96,7	97,3
<b>BR91/99</b>	99,1	98,9	99,8	100,0	99,5	98,9
<b>BR183/98</b>	97,0	98,4	96,3	98,4	95,9	97,3
<b>26P4</b>	95,9	98,2	95,2	98,2	94,9	97,2
<b>CIA-1</b>	95,9	98,2	95,6	99,1	95,2	98,2
<b>ArgA001028</b>	99,0	99,1	99,6	100,0	99,3	99,1
<b>BD-3</b>	96,0	98,6	95,4	98,6	95,1	97,7
<b>CH_CK/04-01/GD/98</b>	97,1	98,2	96,5	98,6	96,2	97,7
<b>704</b>	97,9	98,6	97,6	98,6	97,3	97,7
<b>SMSC-1</b>	97,6	98,2	97,3	98,2	97,0	97,2
<b>3711</b>	95,6	98,6	94,9	98,6	94,6	97,7
<b>Lanlate.NIE/11.02/12</b>	96,3	98,6	95,7	98,6	95,4	97,7
<b>Índia</b>	95,9	97,7	95,2	97,7	94,9	96,8
<b>CAV-B</b>	96,2	98,6	95,6	98,6	95,2	97,7
<b>L-028</b>	97,3	97,7	97,0	97,7	96,7	96,8
<b>Karnataka</b>	96,0	98,2	95,4	98,2	95,2	97,7
<b>SH16</b>	95,7	98,2	95,4	98,2	95,1	97,2
<b>Del-Ros</b>	96,3	98,6	95,7	98,6	95,4	97,7
<b>Pallister</b>	95,4	98,6	94,8	98,6	94,4	97,7

## Conclusões

- A contaminação do genoma de CAV em vacinas atenuadas comerciais da década de 90 parece ter contribuído para a disseminação de CAV e sua alta identidade genética com estirpes isoladas de casos clínicos de CAV isoladas de frangos de corte pode reforçar essa hipótese.
- Demonstra-se a necessidade de avaliação de vacinas atenuadas com metodologia molecular (PCR) de alta sensibilidade e especificidade.

## Referências Bibliográficas

- AMER, H. M.; ELZAHED, H. M.; ELABIARE, E. A. *et al.* An optimized polymerase chain reaction assay to identify avian virus vaccine contamination with Chicken anemia virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v.23, n.1, p. 34-40, 2011
- ADAIR, B. M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. *Dev. Comp. Immunol.*, v. 24, n. 2-3, p. 247– 255, 2000.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; HAFFER, A. A. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, v. 25, n.17, p. 3389-3402, 1997.
- BARRIOS, P. R.; MARIN, S. Y. G.; RIOS, R. L. *et al.* A Retrospective PCR Investigation of Avian Orthoreovirus, Chicken Infectious Anemia and Fowl Aviadenovirus Genomes contamination in Commercial Poultry Vaccines in Brazil. *Arq. Bras. Med.Vet. Zootec.* v.64, n.1, p. 231-235, 2012.
- BARRIOS, P. R.; MARÍN, S. Y.; RESENDE, M. *et al.* Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.11, n.2, p.135-138, 2009.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, n.3, p. 615– 619, 1990.
- BRENTANO, L. Anemia infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J. *et al.* (Eds). *Doenças de aves*. 2. ed. Campinas: FACTA - Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, 2009. p. 735-762.
- BRENTANO, L.; LAZZARIN, S.; BASSI, S. S. *et al.* Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. *Vet. Microbiol.* v.105, n.1, p. 65-72, 2005.
- BRENTANO, L.; SILVA, B. G.; SAYD, S. *et al.* Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte do Brasil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v. 2, n.2, p. 157-179, 2000.
- BRENTANO, L.; MORES, N.; WENTZ, I. *et al.* Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Dis.*, v. 35, n.4, p. 793–800, 1991.
- BROWN, H. K.; BROWNING, G. F.; SCOTT, P. C. *et al.* Full-length infectious clone of a pathogenic Australian isolate of chicken anemia virus. *Aust. Vet. J.*, v.78, n.9, p.637–640, 2000.
- CANAL, C. W.; FERREIRA, D. J.; MACAGNAN, M. *et al.* Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in Southern Brazil. *Pesqui. Vet. Bras.*, v. 24, n.2, p. 89-92, 2004.
- CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A. Distribution of chicken anemia virus in the reproductive tissues of specific pathogen free chickens. *J. Gen. Virol.*, v.81, n.8, p. 2067–2075, 2000.
- CHEATTLE, N. J., EDDY, R. K., WYETH, P. J. *et al.* An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens

- in England. *Vet. Rec.* v.124, n.9, p. 211-215, 1989.
- CHOWDHURY, S. M. Z. H.; OMAR, A. R.; AINI, I. *et al.* Pathogenicity, sequence and phylogenetic analysis of Malaysian Chicken anaemia virus obtained after low and high passages in MSB-1 cells. *Arch. Virol.*, v. 148, n.12, p. 2437–2448, 2003.
- CRAIG M.I.; RIMONDI, A.; DELAMER, M. *et al.* Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007. *Avian Dis.*, v.53, n.3, p. 331-335, 2009.
- CROWTHER, R. A.; BERRIMAN, J. A.; CURRAN, W. L. *et al.* Comparison of the structures of three circoviruses: chicken anemia virus, porcine circovirus type 2, and beak and feather disease virus. *J. Virol.*, v. 77, n. 24, p. 13036-13041, 2003.
- DAVIDSON, I.; ARTZI, N.; SHKODA, I. *et al.* The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. *Virus Res.*, v.132, p. 152-159, 2008.
- DUCATEZ, M. F.; CHEN, H.; GUAN, Y. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus (CAV) in southeastern Chinese live birds markets. *Avian Dis.*, v. 52, n.1, p. 68-73, 2008.
- DUCATEZ M. F.; OWOADE A. A.; ABIOLA J. O. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus in Nigeria. *Arch. Virol.*, v.151, n.1, p. 97-111, 2006.
- ELTAHIR Y.M.; QIAN, K.; JIN, W. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. *Virol. J.*, v. 30, p. 1-8, 2011. Disponível em: <<http://www.virologyj.com/content/pdf/1743-422X-8-145.pdf>>. Acessado em: 25/08/2011.
- FARKAS, T.; MAEDA, K.; SUGIURA, H.; *et al.* A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anemia virus (CAV) in Japan. *Avian Pathol.*, v.27, n.3, p. 316–320, 1998.
- GORYO, M., T.; SUWA, T.; UMEMURA, C. *et al.* Histopathology of chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). *Avian Pathol.*, v. 18, n.1, p. 73-89, 1989.
- GOMES, F. R.; LOBATO, Z. I. P.; OLIVEIRA, D. D. *et al.* Chicken anemia virus: serology in broiler breeders and virus detection in the progeny. *Anais do 16º Encontro Nacional de Virologia*. Campos do Jordão, São Paulo: Sociedade Brasileira de Virologia (SBV), 2005, p. 22-25.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.*, v.41, p. 95-98, 1999.
- HARIDY, M.; GORYO, M.; SASAKI, J.; OKADA, K. Pathological and immunohistochemical study of chickens with co-infection of Marek's disease virus and chicken anemia virus. *Avian Pathol.*, v.38, n.6, p. 469-483, 2009.
- HE, C. Q.; DING, N. Z.; FAN, W. *et al.* Identification of chicken anemia virus putative intergenotype recombinants. *Virol.*, v. 366, n.1 p. 1-7, 2007.
- HOOP, R.K. Persistence and vertical transmission of chicken anemia agent in experimentally infected laying hens. *Avian Pathol.*, v.21, n.3, p. 493-501, 1992.
- HOOP, R. K. Transmission of chicken anaemia virus with semen. *Vet. Rec.*, v.133, p. 551-552, 1993.
- JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *CABIOS*, v. 8, p. 275-282, 1992.
- IMAI, K.; MASE, M.; TSUKAMOTO, K.; *et al.* Persistent infection with chicken anaemia virus and some effects of highly virulent infectious bursal disease virus

- infection on its persistency. *Res. Vet. Sci.*, n. 67, p. 233–238, 1999.
- IMAI, K.; MASE, M.; YAMAGUCHI, N. *et al.* Detection of chicken anaemia virus DNA from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction. *Res. Vet. Sci.*, v. 64, n.3, p. 205–208, 1998.
- ISLAM, M. R.; JOHNE, R.; RAUE, R. *et al.* Sequence analysis of the full-length cloned DNA of chicken anaemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence of genetic grouping of CAV strains based on the deduced VP1 amino acid differences. *J. Vet. Med. B.*, v.49, n. 7, p. 332–337, 2002.
- KAFFASHI, A.; NOORMOHAMMADI, A. H.; ALLOTT, M.L.; *et al.* Viral load in 1-day-old and 6-week-old chickens infected with chicken anaemia virus by the intraocular route. *Avian Pathol.* v.35, n.6, p. 471–474, 2006.
- KIMURA M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.*, v.16, n.2, p. 111–120, 1980.
- LAMICHHANE, C. M.; SNYDER, D. B.; GIRSCHICK, T. *et al.* Development and comparison of serologic methods for diagnosing chicken anemia virus infection. *Avian Dis.*, v.36, p. 725–729, 1992.
- MARKOWSKI-GRIMSRUD, C. J.; MILLER, M. M.; SCHAT, K. A. Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus. *J. Virol. Methods*, v. 101, n. 1–2, p. 135–147, 2002.
- MCNEILLY, F.; SMYTH, J. A.; ADAIR, B. M. *et al.* Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. *Avian Dis.*, v.39, n.3, p. 532–537, 1995.
- MCNULTY, M. S., CONNOR, T. J., MCNEILLY, F. SPACKMAN, D. Chicken anemia agent in the United States: isolation of the virus and detection of antibody in broiler breeder flocks. *Avian Dis.*, n. 33, p. 691–694, 1989.
- MCNULTY, M.S; MACKIE, D.P.; POLLOCK, D.A. *et al.* Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies to chicken anemia agent. *Avian Dis.*, v. 34, n.2, p. 352–358, 1990.
- MCNULTY, M.S.; MCILROY, S.G.; BRUCE, D. W. *et al.* Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. *Avian Dis.*, v. 35, n. 2, p. 263–268, 1991.
- MEEHAN, B. M.; TODD, D.; CREELAN, J. L. *et al.* Characterization of viral DNAs from cells infected with chicken anaemia agent: sequence analysis of the cloned replicative form and transfection capabilities of cloned genome fragments. *Arch. Virol.*, v.124, n.3–4, p. 301–319, 1992.
- MILES, A. M.; REDDY, S. M.; MORGAN, R. W. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. *Avian Dis.*, v.45, n.1, p. 9–18, 2001.
- MILLER, M. M; JAROSINSKI, K. W; SCHAT, K. A. Positive and negative regulation of chicken anemia virus transcription. *J. Virol.*, v.79, n.5, p. 2859 – 2868, 2005.
- MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; HORZINEK, M. C. *et al.* *Circoviridae*. *Veterinary Virology*. 3. Ed. San Diego, California: Academic Press Editora, 1999. p.357–362.
- NOGUEIRA, E. O.; FERREIRA, A. J. P; SOARES, R. M. *et al.* Genome sequencing analysis of Brazilian chicken anemia virus isolates that lack MSB-1 cell culture tropism. *Comp. Immunol. Microb.*, v. 30, n.2, p. 81–96, 2007.



- NOGUEIRA, E. O.; BRENTANO, L.; FERREIRA, A. J. P. A VP3/VP1 gene polymerase chain reaction assay for detection of chicken anemia virus in broiler samples. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, n.2, p. 131-140, 2005.
- NOTEBORN, M. H. M. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms. *Vet. Microbiol.*, n.6, v.98, p.89-94, 2004.
- NOTEBORN, M. H. M.; OORSCHOT, A. A. M. D.; VAN DER, E. B. A. Chicken anemia virus: Induction of apoptosis by a single protein of a single-stranded DNA virus. *Sem. Virol.*, v.8, p. 497-504, 1998.
- NOTEBORN, M. H. M.; KRANENBURG, O.; ZANTEMA, A. *et al.* Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. *Gene*, v.118, n.2, p. 267 - 271, 1992.
- OLUWAYELU, D. O. Diagnosis and epidemiology of chicken infectious anemia in Africa. *Afr. J. Biotechnol.*, v 9, n.14, p. 2043-2049, 2010.
- OLUWAYELU, D. O.; TODD, D. Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis. *Afr. J. Biotechnol.*, v.7, n. 1, p. 271-275, 2008.
- OLUWAYELU, D. O.; TODD, D.; OLALEYE, O. D. Sequence and phylogenetic analysis of chicken anemia virus obtained from backyard and commercial chickens in Nigeria. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, v.75, n.4, p.353-357, 2008.
- PETERS, M. A.; CRABB, B. S.; WASHINGTON, E. A. *et al.* Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. *J. Gen.Virol.*, v. 87, n. 4, p. 823-831, 2006.
- PRINGLE, C. R. Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Arch. Virol.*, n.144, p. 2065-2070, 1999.
- RENSHAW R. W.; SOINÉ C.; WEINKLE T. *et al.* A hypervariable region in VP1 of chicken anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. *J. Virol.*, v.70, n. 12, p.8872-8878, 1996.
- RIOS, R. L. *Diagnóstico molecular de Reovirus e Rotavírus na avicultura industrial de Minas Gerais*. 2010. 30f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- ROSENBERGER, J. K.; CLOUD, S. S. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. *Avian Dis.*, v. 33, n. 4, p. 707-713, 1989.
- ROSENTHAL, A.; COUTELLE, O.; CRAXTON, M. Large-scale production of DNA sequencing templates by microtitre format PCR. *Nucleic Acids Res.*, v. 21, n. 1, p. 173-174, 1993.
- SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS. USA*, v.74, p. 5463-5467, 1997.
- SCHAT, K. A.; SCHUKKEN, Y. H. A longitudinal survey for the presence of antibodies to chicken infectious anemia virus in two specific-pathogen-free strains of chickens. *Avian Dis.*, v.54, p. 46-52, 2010.
- SCHAT, K. A.; VAN SANTEN, V. Chicken anemia virus. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A.M.; GLISSON, J.R. *et al.* (Eds.), *Diseases of Poultry*. Ames: Iowa State University, 12 ed. 2008. p. 211-235
- SCHAT, K.A. Patogenia do vírus da anemia infecciosa das galinhas, a relação hospedeiro-vírus definitiva. In: Conferencia

- Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, p 183-190, 2004.
- SCOTT, A. N. J.; CONNOR, T. J.; CREELAN, J. L. *et al.* Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anaemia virus isolates obtained after multiple cell culture passages. *Arch. Virol.*, v. 144, n. 10, p. 1961-1975, 1999.
- SIMIONATTO, S.; LIMA-ROSA, C. A.; BINNECK, E. *et al.* Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anaemia virus. *Virus Genes*, v. 33, n.1, p. 5-10, 2006.
- SMYTH, J. A.; MOFFETT, D. A.; MCNULTY, M. S. *et al.* A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. *Avian Dis.* v.37, p. 324-338, 1993.
- SMYTH, J. A.; MOFFETT, D. A.; CONNOR T. J. *et al.* Chicken Anaemia virus inoculated by the oral route causes lymphocyte depletion in the thymus in 3-week-old and 6-week-old chickens. *Avian Pathol.*, v. 35 n.3 p. 254 – 259, 2006.
- SOINÉ, C.; WATSON, S. K.; RYBICKI, E. *et al.* Determination of the detection limit of the polymerase chain reaction for chicken infectious anemia virus. *Avian Dis.*, v.37, n.2, p. 467-476, 1993.
- SOMMER F.; CARDONA C. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. *Avian Dis.*, v.47, n.4, p. 1466-1473, 2003.
- SPACKMAN, E.; CLOUD S. S.; POPE, C. R. *et al.* Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototypical isolate. I. Pathogenesis. *Avian Dis.*, n. 46, p. 945-955, 2002.
- TAN, J.; TANNOCK, G. A. Role of viral load in the pathogenesis of chicken anemia virus. *J. Gen. Virol.*, v. 86, n.5, p. 1327-1333, 2005.
- TAMURA K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content bases. *Mol. Biol. Evol.*, v.9, n.4, p. 678-687, 1992.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N. *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, v.28, n.10, p. 2731-2739, 2011.
- THAM, K. M.; STANISLAWEK, W. L. Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus-DNA in tissues and sera. *Avian Dis.*, v. 36, n.4, p. 1000-1006, 1992.
- THOMPSON J. D.; GIBSON T. J.; PLEWNIAK F.; *et al.* The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, v.25, n. 24, p. 4876-4882, 1997.
- TODD, D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. *Vet. Microbiol.*, v.98, n. 2, p.169-174, 2004.
- TODD, D; CREELAN, J. L.; CONNOR, T. *et al.* Investigation of the unstable attenuation exhibited by a chicken anaemia virus isolate. *Avian Pathol.*, v. 32, n.4, p.375-382, 2003.
- TODD, D.; SCOTT, A. N. J.; BALL, N. W.; *et al.* Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates. *J. Virol.*, v. 76, n. 16, p. 8472-8474, 2002.
- TODD, D.; MAWHINNEY, K. A.; MCNULTY, M. S. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.*, v.30, p. 1661-1666, 1992.
- TORO, H. ; RAMIREZ, A. M. & LARENAS, J. Pathogenicity of chicken

- anaemia virus (isolate 10343) for young and older chickens, *Avian Pathol.*, v.26, n.3, p. 485-499, 1997.
- TORO, H.; EWALD, S.; HOERR, F. J. Serological evidence of chicken infectious anemia virus in the united states at least since 1959. *Avian Dis.*, v. 50, n.1, p. 124–126, 2006.
- TORO, H.; VAN SANTEN, V. I.; HOERR, F. J. *et al.* Effects of chicken anemia virus and infectious bursal disease virus in comercial chickens. *Avian Dis.*, v. 53, n.1, p. 94-102, 2009.
- UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). Avicultura Brasileira em 2010: Estatística. Disponível online [www.ubabef.com.br/](http://www.ubabef.com.br/) (Acesso, 28 de fevereiro de 2011).
- VAN SANTEN, V. L.; LI, L.; HOERR, F. J. *et al.* Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama. *Avian Dis.*, v. 45, n. 2, p. 373–388, 2001.
- VIRUS TAXONOMY. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: [www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org). Acessado em:18/10/2011
- VON BÜLOW, V. Avian infectious anaemia and related syndromes caused by chicken anaemia virus. *Crit. Rev. Poultry Biol.*, v. 3, p. 1-17, 1991.
- VON BULOW, V.; SCHAT, K. A. Chicken infectious anemia. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, W. B. (Eds). *Diseases of Poultry*. Ames, IA: Iowa State University Press. 1997. Chapter 30, p.739-756.
- WANG, D.; FAN, W.; HAN, G. Z.; HE, C. Q. The selection pressure analysis of chicken anemia virus structural protein gene VP1. *Virus Genes*. v.38 n.2, p. 259-62, 2009.
- WANG, Q. M.; FAN, G. C.; CHEN, J. Z. *et al.* A putative NES mediates cytoplasmic localization of Apoptin in normal cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, v.36, n. 12, p. 817-823, 2004.
- YUASA, N.; IMAI, K. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). *Avian Pathol.* v. 15, n.4, p. 639-645, 1986.
- YAMAGUCHI, S.; IMADA, T.; KAJI, N. *et al.* Identification of a genetic determinant of pathogenicity in chicken anaemia virus. *J. Gen. Virol.*, v. 82, n. 5, p. 1233–1238, 2001.
- YUASA N., TANIGUCHI T., YOSHIDA I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.*, v. 23, n.2, p. 366-385, 1979.
- YUASA, N.; TANIGUICHI, T.; GODA, M. *et al.* Isolation of chicken anemia agent with MDCC-MSB1 cells from chickens in the field. *Natl. I. Anim. Health Q.*, v. 23, n. 3, p. 75-77, 1983.

## CAPITULO VI - VIRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM OTRAS ESPECIES DE AVES.

### Resumo

As galinhas são o único hospedeiro natural reconhecido para o CAV, mas evidências sorológicas têm revelado a ocorrência desta infecção doença em outras aves domésticas como a codorna Japonesa. Com o objetivo de detectar o DNA de CAV de amostras de aves de diferentes espécies foram testadas amostras de nove plantéis diferentes de codornas, oito plantéis de patos, quatro plantéis de avestruzes, catorze origens diferentes de pombos, 58 aves silvestres, de aves que chegaram de diferentes origens para diagnóstico de diferentes doenças no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG entre os anos de 2006 e 2011. Não foi possível amplificar o genoma de CAV destas amostras confirmando a teoria que CAV é específico de galinhas.

### Introdução

O vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (CAV), descrito pela primeira vez por Yuasa *et al.* (1979) no Japão, produz uma doença imunodepressora de importância econômica, ocasionadas por vírus na produção avícola industrial. O vírus tem transmissão vertical e horizontal (Chettle *et al.*, 1989), sendo a transmissão vertical de grande importância na disseminação e perpetuação do vírus (Hoop, 1993).

No Brasil, Brentano *et al.* (1991) isolaram e identificaram o CAV, pela primeira vez, em frangos de corte que apresentavam sinais de anemia, atrofia dos órgãos linfóides, desuniformidade, imunodepressão e baixos índices produtivos. O CAV já foi identificado e caracterizado em várias partes do mundo, confirmando sua presença em diferentes criações de aves sejam comerciais ou de subsistência e no comércio de aves vivas (Ducatez *et al.*, 2008; Oluwayelu e Todd,

2008; Barrios *et al.*, 2009; Craig *et al.*, 2009).

Segundo o International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV (2006) o gênero Circovirus possui os seguintes representantes: Vírus da Doença do Bico e da Pena (Beak and feather disease virus – BFDV), Circovirus de Pombo (Pigeon circovirus – PiCV), Circovirus de Canário (Canary circovirus – CaCV), Circovirus de Ganso (Goose circovirus – GoCV) e Circovirus Suíno tipo 1 e tipo 2 (Porcine circovirus 1 and 2), sendo o CAV o único representante do gênero Gyrovirus. (Pringle, 1999).

*Gallus gallus domesticus* é o único hospedeiro natural conhecido do vírus e muitos aspectos de sua epidemiologia não estão totalmente esclarecidos, como, por exemplo, a possibilidade de ocorrência do vírus em outras espécies de aves domésticas e silvestres, como pombos, patos, avestruzes, papagaios e pássaros (Barrios,

2009). A presença do CAV em aves silvestres e da fauna e seu papel como potencial imunodepressor não é conhecida. O objetivo deste trabalho foi pesquisar a presença do genoma de CAV em outro tipo de ave diferente das galinhas.

## Material e Metodos

### Amostras

Foram testadas amostras de nove plantéis diferentes de codornas, oito plantéis de patos, quatro plantéis de avestruzes, catorze origens diferentes de pombos, 58 aves silvestres, de aves que chegaram de diferentes origens para diagnóstico de diferentes doenças no Laboratório de Doenças das Aves da Escola de Veterinária da UFMG (Quadro 1) entre 2006 e 2011, todas de diferentes regiões de Minas Gerais.

### Extração e amplificação do DNA

O ácido nucleico dos tecidos foi extraído usando o método de Sílica com iodeto de Sódio (6M), seguindo o protocolo previamente descrito por (Boom *et al.*, 1990). A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro NanoVue® (GE, Healthcare, UK Ltda).

Para a detecção do CAV nos tecidos das aves foi utilizado uma nested-PCR descrita previamente (Cardona *et al.*, 2000) (Quadro

2). Foram usados os iniciadores externos: O3F: 5'-(CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG)-3' e O3R: 3'-(TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT)-5' e iniciadores internos: N3: 5'-(CCA CCC GGA CCA TCA AC)-3' e N4: 3'-(GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C)-5', respectivamente na primeira e segunda reações. Na primeira reação, com volume final de 50µl foram utilizados: 200ng de DNA, Tampão 1X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl), 2mM de dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1µl de cada iniciador externo a 10pmol, 2U de Taq Polimerase (Taq DNA Polymerase – Phorontia, Brasil) e água ultra pura q.s.p. As condições de amplificação foram um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos (min), seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 45°C por 2 min e extensão a 72°C por 1 min, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos, em termociclador (Modelo PTC 100, MJ Research, Watertown, MA, EUA).

A segunda reação (*nested-PCR*) foi realizada em um volume final de 50µl, sendo utilizado como molde 1µl do produto amplificado da primeira reação e 1µl de cada iniciador interno a 10pmol. Os demais reagentes e as concentrações utilizadas foram as mesmas descritas para a primeira reação, assim como o programa de amplificação. Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo o DNA extraído da vacina comercial AviPro Thymovac® (Lohman Animal Health, Brasil).

**Quadro 1.** Amostras clínicas obtidas de diferentes espécies de aves silvestres avaliadas para detecção de parte do genoma de CAV.

<b>Nome comum</b>	<b>Nome científico</b>	<b>No. de aves testadas</b>	<b>Tecido examinados para PCR</b>
Papagaio-verdadeiro	<i>Amazona aestiva</i>	16	Baço, fígado, timo
Maritaca	<i>Aratinga leucophthalma</i>	1	Baço, timo
Marianinha	<i>Pionites leucogaster</i>	5	Baço, timo
Arara Azul grande	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	1	Baço, timo
Arara Canindé	<i>Ara ararauna</i>	1	Baço, timo
Ararajuba	<i>Guaruba guarouba</i>	1	Baço, timo
Maitaca verde	<i>Pionus maximiliani</i>	1	Baço, timo
Curica	<i>Amazona amazônica</i>	1	Baço, timo
Eclétus	<i>Eclétus roratus</i>	1	Baço, timo
Periquito tuim	<i>Forpus crassirostris</i>	1	Baço, timo
Tiriba de orelha branca	<i>Pyrrhura leucotis</i>	1	Baço, timo
Cuiú-cuiú	<i>Pionopsitta pileata</i>	1	Baço, timo
Canário da terra	<i>Sicalis flaveola</i>	1	Baço, timo
Pardal	<i>Passer domesticus</i>	2	Baço, timo
Canário	<i>Serinus canária</i>	5	Baço, timo
Rolinha	<i>Columbina talpacoti</i>	1	Baço, timo
Cardeal amarelo	<i>Gubernatrix cristata</i>	3	Baço, timo
Trinca-ferro-verdadeiro	<i>Saltador similis</i>	1	Baço, timo
Irele	<i>Dendrocygna viduata</i>	1	Baço, timo
Cisne-mudo	<i>Cygnus olor</i>	1	Baço, timo
Garça	<i>Ardea alba</i>	1	Baço, timo
Faisão-eperonier	<i>Polyplectron bicalcaratum</i>	1	Baço, timo
Faisão comum	<i>Phasianus colchicus</i>	3	Baço, timo
Coruja da igreja	<i>Tyto alba</i>	1	Baço, timo
Ema	<i>Rhea americana</i>	1	Baço, timo
Jacu	<i>Penelope obscura obscura</i>	1	Baço, timo

## Quadro 2. Iniciadores para detecção do CAV.

Oligonucleotídeo	Sequência (5'-3')	Gene	Localização no genoma	Sentido	Segmento (pb)	Autores
O3F	CAAGTAATTTCAAATGAACG	VP2 e VP3	462-481	+	387	Cardona <i>et al.</i> , 2000
O3R	TTGCCATCTTACAGTCTTAT		829-848	-		
N3	CCA CCC GGA CCA TCA AC		526-541	+	183	
N4	GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C		687-708	-		

Análise dos produtos amplificados pelos ensaios de PCR

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados sob luz UV após coloração com brometo de etídeo (10mg/ml). A eletroforese ocorreu a 100V em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico), utilizando o padrão molecular de 100 pb DNA Ladder (Invitrogen, São Paulo, Brasil).

### Resultados e discussão

Embora evidências sorológicas tenham revelado a ocorrência deste vírus em outras aves domésticas como a codorna Japonesa (*Coturnix coturnix japonica*) (Farkas *et al.*, 1998) neste estudo não foi possível amplificar o genoma de CAV de amostras de tecidos principalmente baço e timo de patos, codornas, avestruzes, pombos e outras espécies de aves silvestres testadas, confirmando que o CAV afeta unicamente *Gallus gallus domesticus*.

### Conclusão

- O CAV parece ser um vírus específico de galinhas. Não foi possível a detecção pela PCR e semi-nested-PCR nos materiais oriundos de aves silvestres e de outras aves domésticas.

### Referências Bibliográficas

- BARRIOS, P. R.; MARÍN, S. Y.; RESENDE, M. *et al.* Occurrence of chicken anemia virus in backyard chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, Minas Gerais. *Rev. Bras. Cienc. Avic.*, v.11, n.2, p.135-138, 2009.
- BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M. *et al.* Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, v. 37, p. 615– 619, 1990.
- BRENTANO, L.; MORES, N.; WENTZ, I. *et al.* Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. *Avian Dis.*, v. 35, p. 793–800, 1991.
- CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K. A. Distribution of chicken anemia virus in the reproductive tissues of specific pathogen free chickens. *J. Gen. Virol.*, v.81, p. 2067–2075, 2000.

CRAIG M.I.; RIMONDI, A.; DELAMER, M. *et al.* Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007. *Avian Dis.*, v.53, n.3, p. 331-335, 2009.

CHEATTLE, N. J., EDDY, R. K., WYETH, P. J. *et al.* An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in England. *Vet. Rec.* v.124, p. 211-215, 1989.

DUCATEZ, M. F.; CHEN, H.; GUAN, Y. *et al.* Molecular epidemiology of chicken anemia virus (CAV) in southeastern Chinese live birds markets. *Avian Dis.*, v. 52, n.1, p. 68-73, 2008.

FARKAS, T.; MAEDA, K.; SUGIURA, H.; *et al.* A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anemia virus (CAV) in Japan. *Avian Pathol.*, v.27, p. 316-320, 1998.

HOOP, R. K. Transmission of chicken anaemia virus with semen. *Vet. Rec.*, v.133, p. 551-552, 1993.

OLUWAYELU, D. O.; TODD, D. Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis. *Afr. J. Biotechnol.*, v.7, p. 271-275, 2008.

PRINGLE, C. R. Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia. *Arch. Virol.*, n.144, p. 2065-2070, 1999.

VIRUS TAXONOMY. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Disponível em: [www.ictvonline.org](http://www.ictvonline.org). Acessado em: 18/10/2011

YUASA N., TANIGUCHI T., YOSHIDA I. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. *Avian Dis.*, 23 p. 366-385, 1979.