

Priscilla Rochele Barrios

DETECÇÃO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM MINAS GERAIS.

Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Nelson Rodrigo da Silva Martins

UFMG-EV/2009

B 276d Barrios, Priscilla Rochele, 1978-

Detecção do vírus da anemia infecciosa das galinhas em Minas Gerais / Priscilla Rochele Barrios. – 2009.
58 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 das aves – Teses. 3. Anemia – Teses.
I. Martins, Nelson Rodrigo da Silva. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.508 966

Tese defendida em 16 de fevereiro de 2009 e aprovada pela comissão examinadora constituída por:

Prof. Nelson Rodrigo da Silva Martins
Orientador

Prof^ª. Bernadete Miranda dos Santos

Prof^ª. Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha

Prof. Maurício Resende

Prof. Leonardo José Camargos Lara

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e pela oportunidade de conviver ao lado de pessoas muito especiais.

À Universidade Federal de Minas Gerais pela qualidade da estrutura, ambiente e corpo docente.

À Escola de Veterinária pelo acolhimento e oportunidade de crescimento profissional e pessoal.

Ao meu querido orientador professor Nelson Rodrigo da Silva Martins pela confiança, pelo comprometimento e exemplo de dedicação e respeito ao trabalho e às pessoas.

Aos meus co-orientadores, professora Zélia Inês Portela Lobato pela disponibilidade e cobrança de disciplina e José Sérgio Resende pela convivência irreverente, inquieta e estimulante.

Ao professor Maurício Resende por abrir as portas do laboratório de Virologia Comparada e disponibilizar mais do que materiais, principalmente seu conhecimento.

À professora Bernadete Miranda dos Santos e ao professor Leonardo José Camargos Lara pelas amostras cedidas.

Aos mestres pelo conhecimento transmitido e exemplo profissional.

Aos funcionários em especial ao Cláudio e à “querida” Mirli.

Aos membros da banca, professora Bernadete Miranda dos Santos, professora Christiane Maria Barcellos Magalhães da Rocha, professor Maurício Resende e professor Leonardo José Camargos Lara pela disponibilidade e valiosas contribuições que enriqueceram esse trabalho.

Aos amigos do Setor de Doenças das Aves, Sandrinha (meu braço direito latino mais eficiente e estressado e o coração colombiano mais generoso que já conheci), Renata, Flávio, Daniel, Marcus, Mariana, Rodrigo e Ana Maria..... sentirei saudade de todos.

À Maria Rosa, Fabis e Tânia Mara pela ajuda imprescindível com a admirável biologia molecular.

À Universidade Federal de Lavras em especial ao Departamento de Medicina Veterinária pelo incentivo e contribuições para terminar o treinamento de doutorado.

Aos queridos amigos da UFLA em especial ao setor de Medicina Veterinária Preventiva, Dri, Kity, Christian, Geraldo, Totonho, Henriquinho e Santa Rosa pela torcida, palavras e ações de incentivo que permitiram uma caminhada mais tranquila.

Aos meus pais por sonhar meus sonhos e permitir que eu trilhasse o caminho escolhido, só o amor explica tanta dedicação, paciência e generosidade.

Ao meu irmão Felipe pela amizade, carinho e presença nada silenciosa.

Ao meu namorado Túlio pelo incentivo e presença constante e pela vivência da amizade, lealdade, respeito e amor que traz tranquilidade para seguir sempre em frente.

À minha família em especial meus queridos avós Carmem, Rosa, Bento e Luiz, essência do que sou.

À todas as pessoas que participaram e contribuíram para a realização desse trabalho, meu mais sincero e carinhoso muito obrigado.

RESUMO

Foram avaliadas por *nested* – PCR 32 amostras obtidas de galinhas da avicultura industrial, 20 de galinhas de subsistência, 28 amostras de vacinas comerciais e 16 amostras de aves da fauna e exóticas com o objetivo de pesquisar a presença de CAV e caracterizar molecularmente as estirpes encontradas. Quatorze estirpes de CAV foram sequenciadas, incluindo 7 obtidas de galinhas da avicultura industrial, 4 de galinhas de subsistência, 2 presentes em vacinas comerciais e uma de ave da fauna (*Forpus xanthopterygius*). A caracterização genética foi por análise das variações encontradas na região do DNA que codifica para as proteínas VP2 e VP3 de CAV. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com sequências de estirpes de CAV de diferentes partes do mundo disponibilizadas no GenBank. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidas foram alinhadas à sequência da estirpe padrão Cuxhaven-1, utilizada na produção de vacinas comerciais. Os resultados obtidos com a análise filogenética demonstraram que as estirpes do estudo apresentaram similaridade com isolados de várias partes do mundo, não apresentando relação geográfica, mas apresentaram variação discreta quando comparadas à estirpe Cuxhaven-1. As substituições de nucleotídeos não acarretaram mudança na sequência de aminoácidos inferida, com exceção da substituição na posição 153 da VP2 de um A→V. O CAV foi detectado em cinco vacinas, incluindo de produção embrionária (contra a doença de Newcastle e encefalomielite aviária) e de cultivo primário (doença de Marek), todas da década de 90 (1991-1996) e em nenhuma da década atual. A presença do CAV em vacinas vivas comerciais para a avicultura foi considerada decisiva para a alta disseminação do vírus tanto para as aves da avicultura industrial, como da avicultura de subsistência e eventualmente aves da fauna. Foi avaliado também a ocorrência do CAV em galinhas de subsistência, aves da região metropolitana de Belo Horizonte – MG. Em 6/20 (33%) das aves testadas foram detectados o genoma de CAV. A presença de CAV e seu caráter imunodepressor podem representar um transtorno adicional à saúde das aves. A confirmação de CAV na avicultura de subsistência alerta para o trânsito do CAV entre os diferentes sistemas de produção. A infecção por CAV pode ter chegado à avicultura de subsistência a partir de galinhas e frangos industriais em trânsito/transporte para centrais de processamento ou descarte, por convívio ou proximidade com aves industriais, por vacinas contaminadas com CAV e por vacinação contra a anemia infecciosa das galinhas nas aves industriais, entre outros, embora a infecção possa também ter ocorrido de forma independente e por estirpes distintas e exclusivas dessa avicultura.

ABSTRACT

A wide range study was conducted on chicken anemia virus (CAV) in order to investigate the occurrence of CAV in different chicken populations and potential sources of infection. Tissue and biological samples were studied by nested PCR and sequencing, including thirty-two industrial chickens, twenty subsistence chickens, twenty-eight commercial poultry live and inactivated vaccines and sixteen birds of the avian fauna. The fourteen CAV amplicons sequenced included materials from the poultry industry (7), from subsistence chickens (4), from vaccines (2) and from the avian fauna (1). The genetic characterization by variation analyses of the VP2 and VP3 coding regions sequences were compared to sequence data deposited in the GenBank. The nucleotide and deduced amino acid sequences were aligned to the Cuxhaven-1 (Cux-1) prototype strain sequences for comparisons. The phylogenetic analyses of local CAV indicated high similarity of sequences irrespective of source, as well as to CAV sequences published for strains in all continents, although discrete as compared to Cux-1. However, the nucleotide substitutions did not result in amino acid change, except for the VP2 153 position, in which a change from alanine to valine was deduced. CAV was detected in five (5/28; 18%) vaccines produced between 1991 and 1996, including embryo (Newcastle and avian encephalomyelitis) and fibroblast monolayer (Marek's disease) vaccine viruses, but in none produced in the present decade. The detection of CAV in five batches of commercial vaccines of three different major laboratories may be considered an important factor for the present high CAV dissemination. In the subsistence chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte, CAV genome was detected in (6/20; 33%). CAV may be of importance for the free-range chickens, although not as yet evaluated, for its potential immunosuppressive impact. CAV infection in free-range chickens may have also epidemiological importance, as additional source and risk for industrial chickens. Although the original source to free-range chickens might have been the industrial chickens infected, vaccinated with CAV vaccines or given CAV-contaminated vaccines, as indicated by the genetic similarity of strains, native free-range strains might also occur.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	12
CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
1 Família <i>Circoviridae</i>	14
2 Vírus da Anemia das Galinhas.....	15
2.1 <i>Características do vírus</i>	15
2.2 <i>Epidemiologia</i>	17
3 Anemia Infecciosa das Galinhas.....	18
3.1 <i>A Doença</i>	18
3.2 <i>Lesões</i>	19
3.3 <i>Controle</i>	19
3.4 <i>Diagnóstico</i>	20
Referência Bibliográfica.....	21
CAPÍTULO II - MATERIAL E MÉTODOS.....	24
1 Amostras.....	24
2 Extração de DNA total.....	25
2.1 <i>Extração de DNA por sílica</i>	27
3 Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA.....	26
4 Condições da reação em cadeia pela polimerase – <i>nested (nested – PCR)</i> para amplificação das regiões genômicas que codificam para a síntese de VP2 e VP3 do CAV.....	26
4.1 <i>PCR – específica (1ª reação – iniciadores externos)</i>	26
4.2 <i>Nested - PCR (2ª reação – iniciadores internos)</i>	27
5 Análise dos produtos amplificados pelos ensaios de PCR.....	27
6 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento.....	27
7 Sequenciamento genético.....	27
7.1 <i>Reação de sequenciamento</i>	28
8 Análise computacional das sequências.....	28
8.1 <i>Montagem e edição das sequências nucleotídicas</i>	28
8.2 <i>Busca das sequências similares em bancos de dados</i>	28
8.3 <i>Alinhamento das sequências</i>	28
8.4 <i>Análises filogenéticas</i>	29
Referência Bibliográfica.....	29
CAPÍTULO III – ESTUDO FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM MINAS GERAIS.....	30

Resumo.....	30
Summary.....	30
Introdução.....	31
Material e métodos.....	32
<i>Amostras</i>	32
<i>Extração de DNA total</i>	32
<i>Nested-PCR</i>	32
<i>Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento</i>	33
<i>Sequenciamento genético</i>	33
<i>Análise computacional das sequências</i>	33
<i>Alinhamento das sequências</i>	34
<i>Análises filogenéticas</i>	34
Resultados e discussão.....	34
Referência Bibliográfica.....	38
CAPÍTULO IV – DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM <i>FORPUS XANTHOPTERYGIUS</i> - PERIQUITO TUIM.....	40
Referência Bibliográfica.....	43
CAPÍTULO V – DETECÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM VACINAS AVÍCOLAS COMERCIAIS NO BRASIL.....	44
Resumo.....	44
Summary.....	44
Introdução.....	44
Material e métodos.....	45
<i>Amostras</i>	45
<i>Extração de DNA total</i>	45
<i>Nested-PCR</i>	45
Resultados e discussão.....	46
Referência Bibliográfica.....	47
CAPÍTULO VI - OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS NA AVICULTURA DE SUBSISTÊNCIA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS.....	49
Resumo.....	49
Summary.....	49
Introdução.....	50

Material e métodos.....	52
<i>Amostras</i>	52
<i>Extração de DNA total</i>	52
<i>Nested-PCR</i>	52
Resultados e discussão.....	53
Referência Bibliográfica.....	55
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III - ESTUDO FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM MINAS GERAIS.

Tabela 1 - Identificação das amostras positivas para CAV por <i>nested</i> -PCR utilizadas no estudo filogenético.....	32
--	----

CAPÍTULO V – DETECÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM VACINAS AVÍCOLAS COMERCIAIS NO BRASIL.

Tabela 1 - Pesquisa de CAV por <i>nested</i> -PCR em vacinas avícolas comerciais.....	46
---	----

CAPÍTULO IV - OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS NA AVICULTURA DE SUBSISTÊNCIA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS.

Tabela 1 - Pesquisa de CAV por <i>nested</i> – PCR em galinhas da avicultura de subsistência na região metropolitana de Belo Horizonte.....	53
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 - Organização do genoma do CAV. O CAV codifica um único transcrito policistrônico, que contém três janelas abertas de leitura com sobreposição parcial, que codificam para as três proteínas virais VP1, VP2 e VP3 e uma região não transcrita que compreende a região promotora. (Adaptado de TODD, 2000).....	15
--	----

CAPÍTULO III - ESTUDO FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA ANEMIA
INFECCIOSA DAS GALINHAS EM MINAS GERAIS

Figura 1 - Análise filogenética da região do genoma de CAV que codifica para as proteínas VP2 e VP3.....	35
Figura 2 - Alinhamento de nucleotídeos das amostras positivas para CAV em comparação com sequência depositada no GenBank de Cuxhaven-1, estirpe utilizada em vacinas comerciais.....	37
Figura 3 - Alinhamento de aminoácidos da VP2 das amostras positivas para CAV em comparação com sequência depositada no GenBank de Cuxhaven-1, estirpe utilizada em vacinas comerciais.....	37

INTRODUÇÃO

A produção avícola é muito importante para o mercado brasileiro, assumindo grande importância social e econômica. Tanto como produtora de proteína animal de baixo custo, e dessa forma acessível a várias camadas econômicas da população, como sendo importante geradora de divisas pelo seu impacto positivo na balança comercial do país.

A avicultura brasileira ocupa posição de destaque no cenário mundial, o Brasil é o principal país exportador de carne de frango. Segundo boletim divulgado pelo Serviço de Comercialização Agrícola do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA), para 2009, é projetado um crescimento de apenas 0,73% na produção norte-americana de carne de frango, contra uma expansão de 4,79% para a produção brasileira.

Esse cenário positivo é confirmado pelos números relativos às exportações de carne de frango que totalizaram, no acumulado de 2008, 3.455.864.512 quilos de frango, número 7,72% superior ao de 2007, quando o país vendeu para o mercado externo 3.188.973.181 quilos.

Associado ao aumento das exportações é observado aumento da produção total de pintos de corte no país. Até agosto de 2008 a produção total de pintos de corte foi de 3.599.360.276 aves, um aumento de mais de 6% em comparação com o mesmo período em 2007.

No Brasil as principais empresas do setor, responsáveis por esses bons índices, trabalham em sistemas de integração, que

facilitam a logística de produção e diminuem os gastos com transporte. Dessa forma as granjas integradas tendem a se concentrar em uma região ocasionando um aumento da população de aves no local.

A intensificação da avicultura associada a condições ambientais e práticas de manejo estressantes, que muitas vezes não contemplam estratégias eficazes de controle ambiental de agentes patogênicos, é responsável pelo aumento dos desafios sanitários.

Dentre as doenças de importância para a avicultura de produção, as doenças imunodepressoras merecem destaque, uma vez que estão associadas a queda no desempenho das aves, falhas de resposta vacinal a outras doenças, predisposição a agentes secundários, aumento dos custos de produção e geração de produto com baixo valor econômico.

As principais doenças imunodepressoras em frangos são a anemia infecciosa das galinhas e a doença infecciosa da bolsa cloacal.

A anemia infecciosa das galinhas merece destaque e vem sendo diagnosticada em vários plantéis de produção, inclusive plantéis SPF (*specific pathogen free* – livre de patógenos específicos) utilizados na pesquisa científica e para a produção de imunobiológicos.

Estudos utilizando testes de ELISA para a detecção de anticorpos em matrizes evidenciaram uma elevada prevalência do vírus da anemia infecciosa das galinhas (*chicken anemia virus* – CAV) nas empresas avícolas do Brasil.

A anemia infecciosa das galinhas é uma doença de aves jovens, caracterizada por marcada anemia, aplasia da medula óssea, mortalidade variável e atrofia generalizada de órgãos linfóides. Esta doença está freqüentemente associada a infecções secundárias provocadas por vírus, bactérias ou fungos.

O CAV é um vírus com genoma de DNA fita simples positiva, não envelopado, com simetria icosaédrica e 25 nm de diâmetro. Pertence a família *Circoviridae*, gênero *Gyrovirus*.

Este vírus foi isolado pela primeira vez no Japão em 1979. Desde então, sua presença tem sido descrita em criações comerciais em quase todo o mundo. No entanto, muitos aspectos relacionados à patogenia e epidemiologia do agente ainda permanecem desconhecidos.

A transmissão do CAV se dá verticalmente, por infecção de ovos provenientes de aves infectadas, tanto soronegativas, quanto na presença de altos níveis de anticorpos neutralizantes e horizontalmente, de aves infectadas para aves suscetíveis. Porém é desconhecido o papel de outras espécies na transmissão desse agente, auxiliando a dispersão tanto dentro de uma mesma granja, como entre granjas e até entre diferentes regiões.

Várias técnicas são utilizadas na pesquisa de CAV como, por exemplo, isolamento viral, detecção de anticorpos ou identificação de segmentos do genoma.

O isolamento viral apresenta baixa sensibilidade, diferenças genéticas interferem na replicação do vírus em cultivo celular, o que impossibilita o isolamento de algumas estirpes. Já os testes sorológicos indicam uma exposição prévia ao vírus e não uma infecção presente.

Os resultados obtidos com os soros de frangos de corte sem anticorpos para o CAV e positivos na *nested*-PCR sugerem que frangos sem anticorpos para o CAV, mas com infecção recente, estão presentes no momento do abate. Isso revela que a utilização de testes de diagnóstico baseados na detecção de anticorpos pode ser pouco informativa no monitoramento das infecções causadas por este vírus.

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a detecção de parte o DNA do CAV de forma rápida e econômica. Associada ao sequenciamento a PCR permite estabelecer relações filogenéticas entre diferentes estirpes, auxiliando no entendimento da biologia molecular e epidemiologia do agente.

Esse trabalho teve como objetivo pesquisar a presença do genoma de CAV por *nested*-PCR, tanto em criações comerciais da avicultura industrial, como em criações de subsistência, assim como pesquisar a presença do agente em outras espécies de aves, incluindo da fauna silvestre e exóticas, e vacinas comerciais da década de 90 e atuais. Os amplificados genômicos foram caracterizados por sequenciamento e as relações filogenéticas entre os mesmos avaliada.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Família *Circoviridae*

Os vírus membros da família *Circoviridae* apresentam algumas similaridades na estrutura do virion e nas propriedades genéticas, porém apresentam pequenas diferenças ecológicas, biológicas e antigênicas. Determinantes antigênicos e sequências homólogas entre os diferentes vírus não são comuns (MURPHY *et al.*, 1999).

Os virions dessa família são não envelopados, com 14 a 26,5 nm de diâmetro e simetria icosaédrica. O genoma consiste de uma fita única de DNA circular que varia de 1,7 a 2,3 Kb de tamanho (TODD, 2000).

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),
- circovírus de canário (*Canary circovirus* – CaCV),
- circovírus de ganso (*Goose circovirus* – GoCV),
- circovírus de pombo (*Pigeon circovirus* – PiCV),
- circovírus suíno tipo 1 (*Porcine circovirus 1* – PCV-1),
- circovírus suíno tipo 2 (*Porcine circovirus 2* – PCV-2).

O gênero *Gyrovirus* possui como único representante o vírus da anemia infecciosa das galinhas (*Chicken anemia virus* – CAV) (PRINGLE, 1999).

Em relação à organização do genoma e à forma de expressão genética, os *Circovirus* utilizam uma estratégia transcricional ambisense, já o CAV possui os genes codificadores compreendidos em uma única fita senso (MURPHY *et al.*, 1999).

Análises da estrutura do genoma, da origem de replicação e das proteínas Rep dos *Circovirus* demonstraram similaridade com os membros da família *Nanoviridae* e similaridade menos pronunciada aos vírus de planta membros da família *Geminiviridae* (ICTV, 2006).

Já o CAV, apresenta características comuns com os vírus humanos Torque Teno virus (TTV) e o Torque Teno mini virus (TTMV), que são membros do gênero *Anellovirus* (ICTV, 2006). O TTV foi completamente sequenciado e encontrou-se uma organização genômica muito parecida à do CAV, incluindo uma região rica em

GC de 36 nucleotídeos com 80±6% de identidade à cepa Cuxhaven -1 de CAV (MIYATA *et al.*, 1999).

Os vírus dessa família são muito resistentes, tendo permanecido viáveis mesmo quando tratados a 70°C por 15 minutos e pH 3,0 (ALLAN *et al.*, 1994), são muito resistentes no ambiente o que interfere diretamente na epidemiologia e no controle das doenças causadas por eles (TODD, 2000).

2. Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas

2.1. Características do vírus

O CAV é um vírus não envelopado com genoma de DNA fita simples circular

de aproximadamente 2,3 Kb (TODD *et al.*, 1990).

O genoma do CAV contém uma única região promotora/enhancer e três genes (Fig. 1). Durante a infecção nas células alvo o genoma do CAV replica pela formação de um intermediário de DNA dupla fita. A partir desta molécula dupla fita um único mRNA transcrito codifica três proteínas distintas: VP1, VP2 e VP3 (NOTEBORN, 2004).

A VP1 com 51,6 kDa é a proteína estrutural do capsídeo viral (NOTEBORN e KOCH, 1995). A VP2 com 24 kDa é uma fosfatase (PETERS *et al.*, 2002). A VP3 com 13,6 kDa, também chamada de apoptina, é uma forte indutora de apoptose em tímócitos e células linfoblásticas de galinhas (NOTEBORN *et al.*, 1994a).

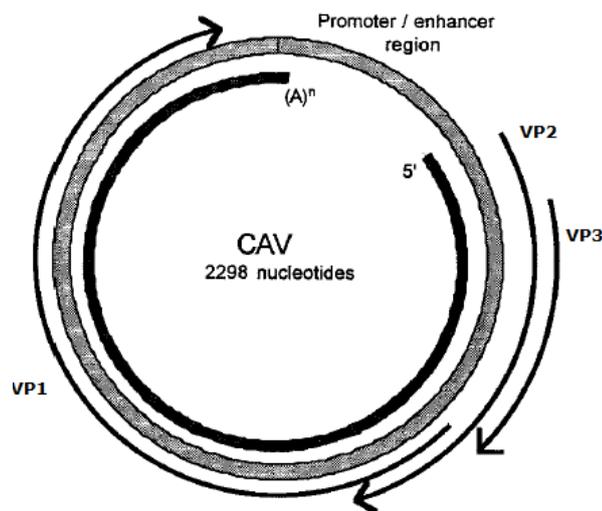


Figura 1: Organização do genoma do CAV. O CAV codifica um único transcrito policistrônico, que contém três janelas abertas de leitura com sobreposição parcial, que codificam para as três proteínas virais VP1, VP2 e VP3 e uma região não transcrita que compreende a região promotora. (Adaptado de TODD, 2000).

Dados de KOCH *et al.* (1995), demonstraram que a imunização com um vírus recombinante que expressa VP1 e VP2 é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes enquanto que a produção separada de VP1 e de VP2 não apresenta essa característica. Assim, apesar do capsídeo de CAV conter somente a VP1, a coexpressão de VP2 é necessária para a indução de anticorpos neutralizantes.

Experimentos de imunoprecipitação demonstraram que VP1 e VP2 interagem, indicando que a proteína não estrutural VP2 parece atuar como um modelo estrutural (*scaffold*) na montagem do capsídeo viral (NOTEBORN *et al.*, 1998b).

A VP3 é uma proteína de 121 aminoácidos, que contém muitos resíduos de prolina, serina e treonina e que possui aminoácidos carregados positivamente na região C-terminal. A polaridade de carga residual positiva em VP3 permite sua interação com moléculas de ácido nucléico (NOTEBORN *et al.*, 1998a). A presença da VP3 na estrutura da cromatina, associado ao seu alto conteúdo em prolina, poderia causar transtornos na conformação super-enrolada da dupla hélice, que poderia resultar na apoptose. Outra possibilidade é a VP3 atuar como um regulador transcricional dos genes da apoptose celular (NOTEBORN *et al.*, 1998a).

PETERS *et al.*, 2006, observaram que o trânsito de VP3 para o núcleo, pode ser alterado por VP2 mutadas. Assim a VP2

atuaria na fosforilação da VP3, ativando-a e induzindo a apoptose celular. Dessa forma tanto a VP3 como a VP2 contribuiriam para a patogenicidade de estirpes de CAV (NOTEBORN, 2004).

A região promotora do CAV é formada por quatro a cinco repetições diretas em tandem, contendo um inserto de 12 pares de bases depois das duas primeiras repetições, sendo esta, indispensável para uma replicação viral eficiente (NOTEBORN *et al.*, 1994b). Experimentos de NOTEBORN *et al.* 1998c, demonstraram que mutações nessa região reduziram a quantidade de vírus liberado e a citopatogenicidade.

Alterações de alguns aminoácidos na VP1 provocam atenuação de linhagens de CAV (TODD *et al.*, 2002). Concordando com essa afirmação, estudo filogenético com amostras brasileiras realizados por SIMIONATTO *et al.* (2006), encontrou na VP1, nucleotídeos diferentes em 42 posições, que resultou em alteração de nove aminoácidos em estirpes com patogenicidade diferentes.

NOGUEIRA *et al.* (2007), sequenciando os genes codificadores das proteínas VP2, VP3 e parte da VP1, encontraram que isolados brasileiros que perderam a capacidade de replicar em cultivo celular apresentavam substituição nos genes codificadores das três proteínas, indicando que mutações nesses genes podem interferir com a citopatogenicidade do CAV.

FARKAS *et al.* (1996), já havia encontrado mudança de posição de seis aminoácidos na porção C-terminal de VP3 e quatro alterações na porção C-terminal de VP2. Este estudo indicou ainda que metade da região N-terminal de VP3 e três quartos da região N-terminal da VP2 são conservadas e que isso poderia estar relacionado à manutenção da função protéica, no entanto não realizou nenhum estudo de comparação de patogenicidade entre as diferentes estirpes.

SCOTT *et al.* (2001), trabalhando com estirpes atenuadas resistentes à neutralização com anticorpos monoclonais que neutralizam a cepa Cuxhaven-1 de CAV, também sugeriram que a atenuação observada poderia estar associada à alterações na região C-terminal de VP2 e VP3.

PETERS *et al.* (2007) atenuaram estirpes de CAV através de mutações sitio dirigidas no gene que codifica para a VP2, demonstrando que a VP2 é importante para a patogenicidade de CAV.

2.2. Epidemiologia

O CAV foi isolado pela primeira vez no Japão em 1979 (YUASA *et al.*, 1979). Desde então, sua presença tem sido descrita em criações comerciais em quase todo o mundo (SCHAT, 2003).

Um estudo de prevalência realizado por BRENTANO *et al.* (2000), indicou que 92% das matrizes pesadas testadas apresentaram anticorpos anti-CAV, demonstrando a alta prevalência desse vírus na avicultura industrial brasileira. CANAL *et al.* (2004), verificaram que 100% dos lotes de matrizes analisados tiveram pelo menos uma ave soro positiva, reforçando a alta prevalência e distribuição do vírus no Brasil. Em Minas Gerais, GOMES *et al.* (2005) demonstraram que 97,2% das matrizes de uma linhagem pesada da avicultura industrial apresentaram sorologia positiva para CAV (ELISA) a partir da 17ª semana de idade. Para a soroconversão às 17 semanas de idade, os autores cogitaram a possibilidade de desafio natural entre a 12ª e 15ª semanas.

O CAV se dissemina tanto horizontalmente como verticalmente. A transmissão horizontal acontece via rota fecal-oral, embora a infecção via trato respiratório já tenha sido demonstrada em aves infectadas experimentalmente (ROSENBERGER *et al.*, 1989).

A transmissão vertical é considerada a maneira mais importante de disseminação do vírus (HOOP, 1992), pelo seu papel na perpetuação da geração de progênes infectadas. É bem definido que a transmissão do CAV se dá verticalmente, de ovos provenientes de aves infectadas tanto soronegativas (CHETTLE *et al.*, 1989) quanto na presença de altos níveis de

anticorpos neutralizantes (BRENTANO *et al.*, 2005).

No campo, a doença aguda ocorre principalmente em aves jovens de 10 a 14 dias de idade infectadas verticalmente (YUASA *et al.*, 1987). Aves velhas são susceptíveis à replicação viral, mas não desenvolvem sinais clínicos (VON BULOW, 1991).

Estudos em surtos de CAV indicam que a transmissão do vírus para a progênie acontece de 3 a 6 semanas após a infecção inicial e que durante esse período a maioria das matrizes permanecem infectadas e disseminando o agente horizontalmente (MCNULTY, 1991).

Até o momento, as galinhas parecem ser o único hospedeiro do vírus (TODD, 2004).

3. Anemia Infecciosa das Galinhas

3.1. A doença

A doença é caracterizada por aumento da mortalidade, redução do ganho de peso, anemia, hipotrofia da medula óssea e atrofia do timo (ROSENBERGER e CLOUD, 1998).

Os primeiros sinais clínicos são observados em aves com idade entre 7 e 14 dias. As aves acometidas apresentam depressão e as taxas de mortalidade podem

atingir 60%, no entanto taxas entre 5 a 15% são mais comuns (TODD, 2004).

Com base em estudos imunocitoquímicos, ultraestruturais e virológicos, muitas evidências indicam que os sítios de replicação viral são os hemocitoblastos da medula óssea e os linfócitos precursores no timo (TODD, 2004). Sua destruição resulta em severa depleção de células mielóides e linfóides resultando no surgimento da anemia, que é a característica principal da doença (SMYTH *et al.*, 1993).

Ensaio de infecção experimental em aves SPF de 1 dia de idade demonstraram que a repopulação das células sanguíneas e do timo iniciam próximo do dia 16, estando finalizada pelos dias 32 e 36. No entanto, o vírus pode ser recuperado de alguns tecidos em aves com mais de 49 dias, e lesões histológicas e antígenos virais podem ser detectados depois de 26 dias, sugerindo que a doença é transiente (TODD, 2004).

Galinhas imunologicamente maduras produzem anticorpos protetores que previnem o desenvolvimento de lesões e dessa maneira a doença clínica em aves adultas (MILLER e SCHAT, 2004). Porém, aves com mais de três semanas de vida podem desenvolver lesões ou viremia persistente quando o sistema imune é comprometido por outros patógenos como, por exemplo, reovírus, vírus da doença infecciosa da bolsa cloacal ou vírus da doença de Marek. Nesses casos, ocorre

destruição de linfócitos B, interferindo na resposta imune contra CAV (TODD, 2004).

O quadro de imunodepressão apresentado pelas aves pode predispor às lesões de pele com contaminação bacteriana secundária e dermatite gangrenosa. Além de interferir negativamente na resposta vacinal contra diferentes agentes (TODD, 2004).

3.2. Lesões

As lesões macroscópicas incluem anemia (valores de hematócrito de 6 a 27, sendo que o normal é 29), medula óssea pálida e timo, baço e bursa diminuídos de volume, com a severidade das lesões diretamente relacionadas a presença de infecção por outros agentes (TODD, 2004).

As maiores mudanças histopatológicas são redução de elementos hematopoiéticos da medula óssea e severa depleção de linfócitos no timo seguido por hiperplasia de células reticulares (SCHAT, 2003).

A depleção de timócitos observada após a infecção com CAV é causada por apoptose. Análises por microscopia eletrônica de células infectadas por CAV revelaram células contendo cromatina condensada próxima à membrana nuclear e corpos apoptóticos no citoplasma de células epiteliais (JEURISSEN *et al.*, 1992).

Os hemocitoblastos, dentre outras células, dão origem aos trombócitos, e a

redução desses está, provavelmente, relacionado com o aumento das hemorragias musculares observadas em casos de anemia infecciosa das galinhas (MCNULTY, 1991).

3.3. Controle

A ocorrência disseminada de CAV, os altos níveis de excreção viral e a viabilidade do vírus no ambiente sugerem que a erradicação da infecção não é uma opção prática (MCNULTY, 1991).

O CAV apresenta elevada resistência à grande maioria dos tratamentos normalmente empregados na limpeza e desinfecção do ambiente, inclusive fumigação com formol, permitindo que o vírus persista por longos períodos nas instalações (SCHAT, 2003).

Como não é possível prevenir totalmente a exposição ao CAV, é importante minimizar os efeitos negativos da infecção pela adoção de medidas de biossegurança e pelo controle de outros agentes imunodepressores que associados à CAV podem agravar o quadro de imunodepressão (ROSENBERGER e CLOUD, 1998).

Por outro lado, a indução de títulos protetores de anticorpos anti-CAV no soro de matrizes precisa ser realizada para prevenir a disseminação da doença e limitar

as perdas econômicas (NOGUEIRA-DANTAS *et al.*, 2007).

No Brasil, uma vacina atenuada para a imunização das matrizes vem sendo utilizada, com o objetivo de controlar a doença clínica no campo através da transferência de altos títulos de anticorpos maternos para a progênie. No entanto, estudos realizados por CARDONA *et al.* (2000), sugerem que o vírus pode persistir em tecidos reprodutivos por longos períodos, mesmo depois de ter havido a soroconversão. A detecção de CAV em embriões oriundos de matrizes com sorologia positiva indicou que o mesmo pode ser transmitido verticalmente mesmo de matrizes imunocompetentes (BRENTANO *et al.*, 2005).

3.4. Diagnóstico

O diagnóstico da infecção pelo CAV pode ser feito através do isolamento viral, da detecção de anticorpos anti-CAV ou pela amplificação de genes específicos (SCHAT, 2003).

O isolamento viral é uma técnica trabalhosa, cara e no caso de CAV pode apresentar resultados falso negativos, uma vez que algumas cepas de CAV perderam a capacidade de replicar em cultivo celular devido a alterações genéticas (ISLAM *et al.*, 2002).

A detecção de anticorpos pode ser feita através de testes de ELISA, soroneutralização e imunofluorescência indireta (SCHAT, 2003).

A soroneutralização é uma técnica bastante sensível, no entanto é cara e os resultados demoram cerca de três semanas para serem obtidos, inviabilizando seu uso em estudos mais extensos e no diagnóstico de rotina (SCHAT, 2003).

Devido à facilidade e rapidez o teste de ELISA vem sendo utilizado no diagnóstico sorológico de CAV (NOGUEIRA-DANTAS *et al.*, 2007), no entanto os testes sorológicos indicam uma exposição prévia ao vírus e não uma infecção presente (SCHAT, 2003).

A reação em cadeia pela polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a detecção do DNA do CAV de forma rápida e econômica. O sequenciamento e análise dos produtos da PCR permite estabelecer relações filogenéticas entre diferentes isolados e estirpes, auxiliando assim, o entendimento da biologia molecular e epidemiologia do agente.

Reações de *nested*-PCR demonstraram ser mais específicas e até 100 vezes mais sensíveis que PCRs convencionais (CARDONA *et al.*, 2000, IMAI, *et al.* 1998, SIMIONATTO *et al.*, 2005).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAN, G. M., PHENIX, K. V., TODD, D., et al. *Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus*. J. Vet. Med., 41:17–26, 1994.
- 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., 105:65-72, 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*. Revta Bras. Ciênc. Avícola 2:157-179, 2000.
- CANAL, C. W., FERREIRA, D. J., MACAGNAN, M., et al. *Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in southern Brazil*. Pesq. Vet. Bras. 24:89-92, 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. 81:2067–2075, 2000.
- CHEITTLE, 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. 124:211-215, 1989.
- FARKAS, T., TANAKA, A., KAI, K., et al. *Cloning and sequencing of the genome of chicken anaemia virus (CAV) TK-5803 strain and comparison with other CAV strains*. J. Vet. Med. Sci. 58:681–684, 1996.
- 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*. XVI Encontro Nacional de Virologia, Campos do Jordão, São Paulo, 2005.
- HOOP, R. K. *Persistence and vertical transmission of chicken anemia agent in experimentally infected laying hens*. Avian Pathol, 21:493–501, 1992.
- ICTV - International Committee on Taxonomy of Viruses. *Index of Viruses - Circoviridae*. In: ICTVdB - The Universal Virus Database, version 4. Büchen-Osmond, C (Ed), Columbia University, New York, USA, 2006.
- IMAI, K., MASE, M., YAMAGUCHI, S., et al. *Detection of chicken anemia virus from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction*. Res. Vet. Sci. 64:205–208, 1998.
- ISLAM, M. R., JOHNE, R., RAUE, R., et al. *Sequence analysis of the full-length cloned DNA of chicken anemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence for genetic grouping of CAV strain based on the deduced amino acid sequence*. J. Vet. Med. 49:332–337, 2002.
- JEURISSEN, S. H. M., WAGENAAR, F., POL, J. M. A., et al. *Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection*. J. Virol. 66:7383–78, 1992.
- KOCH, G., VAN ROOZELAAR, D. J., VERSCHUEREN, C. A., et al. *Immunogenic and protective properties of chicken anemia virus proteins expressed by baculovirus*. Vaccine 13:763–770, 1995.
- MCNULTY, M. S. *Chicken anemia agent: a review*. Avian Pathol. 20:187–203. 1991.
- MILLER, M. M., SCHAT, K. A. *Chicken infectious anemia virus: An example of the ultimate host-parasite relationship*. Avian Dis. 48:734–745, 2004.
- MIYATA, H.; TSUNODA, H.; KAZI, A.; et al. *Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus*. J. Virol., 73:3582-3586, 1999.

- MURPHY, F. A., GIBBS, E.P.J., HORZINEK, M. C., et al. *Circoviridae* In: Veterinary Virology Academic Press, 1999. p 357–362
- NOGUEIRA-DANTAS, E. O., FERREIRA, A. J. P., ASTOLFI-FERREIRA, C. S., et al. *Cloning and expression of chicken anemia virus VP3 protein in Escherichia coli*. Comp. Immunol., Microbiol. Infect. Dis. 30:133–142, 2007.
- 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., Microbiol. Infect. Dis. 30:81–96, 2007.
- NOTEBORN, M. H. M. *Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms*. Vet. Microbiol. 98:89-94, 2004.
- NOTEBORN, M. H. M., DANEN-VAN OORSCHOT, A. A. A. M., VAN DER EB, A. J. *Chicken anemia virus: induction of apoptosis by a single protein of a single-strand DNA virus*. Semin. Virol. 8:497–504, 1998a.
- NOTEBORN, M. H. M., KOCH, G. *Chicken anemia infection: Molecular basis of pathogenicity*. Avian Pathol. 24:11-31, 1995.
- NOTEBORN, M. H. M., TODD, D., VERSCHUEREN, C. A. J., et al. *A single chicken anaemia virus protein induces apoptosis*. J Virol, 68:346–51, 1994a.
- NOTEBORN, M. H. M., VERSCHUEREN, C. A. J., KOCH, G. *Simultaneous expression of recombinant baculovirus-encoded chicken anemia virus (CAV) proteins VP1 and VP2 is required for formation of the CAV-specific neutralizing epitope*. J. Gen. Virol. 79:3073–3077, 1998b.
- NOTEBORN, M. H. M., VERSCHUEREN, C. A. J., VAN ORMONDT, et al. *Chicken anemia virus strains with a mutated enhancer/promoter region share reduced virus spread and cytopathogenicity*. Gene 223:165–172, 1998c.
- NOTEBORN, M. H. M., VERSCHUEREN, C. A. J., ZANTEMA, A., et al. *Identification of the promoter region of chicken anemia virus (CAV) contain a novel enhancer - like element*. Gene 150:313–318, 1994b.
- PETERS, M. A., CRABB, B. S., TIVENDALE, K., et al. *Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2*. J. Gen. Virol. 88:2168–2175, 2007.
- 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. 87:823–831, 2006.
- PETERS, M. A., JACKSON, D. C., CRABB, B. S., et al. *Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase*. J Biol Chem, 277:39566–73, 2002.
- PRINGLE, C. R. *Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia*. Arch. Virol. 144:2065-2070, 1999.
- ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. *Chicken anemia virus*. Poult Sci, 77:1190–2, 1998.
- ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. *The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA)*. Avian Dis, 33:753–9, 1989.
- SCHAT K.A. *Infectious anemia*. In: Saif Y.M., Barnes H.J, Fadly A.M., Clisson J.R., McDougald L.R. & Swayne D.E. Diseases of Poultry. Ames Iowa State University 2003. 11. ed., p.182-202.
- SCOTT, A. N., MCNULTY, M. S., TODD, D. *Characterisation of a chicken anaemia virus variant population that resists neutralisation with a group-specific monoclonal antibody*. Arch Virol. 146:713–728, 2001.

- SIMIONATTO, S., LIMA-ROSA, BINNECK, E., et al. *Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anaemia virus*. *Virus Gen.* 33:5-10, 2006.
- SIMIONATTO, S., LIMA-ROSA, C. A. V., RUBIN, L. L., et al. *Um protocolo de “nested-pcr” para detecção do vírus da anemia das galinhas*. *Pesq. Vet. Bras.* 25:106-110, 2005.
- SMYTH, J. A., MOFFETT, D. A., MCNULTH, M. S., et al. *A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age*. *Avian Dis.* 37:324-338, 1993.
- TODD, D. *Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS*. *Vet. Microbiol.* 98:169–174, 2004.
- TODD, D. *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. *Avian Pathol.* 29:373–394, 2000.
- TODD, D., CREELAN, J. L., MACKIE, D. P., et al. *Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent*. *J Gen Virol*, 71:819–23, 1990.
- 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.* 76:8472–8474, 2002.
- VON BULOW, V. *Avian infectious anaemia and related syndromes caused by chicken anaemia virus*. *Crit Rev Poultry Biol*, 3:1–17, 1991.
- YUASA, N., IMAI, K., WATANABE, K., et al. *Aetiological examination of an outbreak of haemorrhagic syndrome in a broiler flock in Japan*. *Avian Pathol*, 16:521–526, 1987.
- YUASA N., TANIGUCHI T., YOSHIDA I. *Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks*. *Avian Dis.* 23:366-385, 1979.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

1. Amostras

Desde o primeiro relato de CAV em plantéis brasileiros (BRENTANO *et al.*, 1991), muitos trabalhos foram realizados com o objetivo de entender a distribuição do CAV nos plantéis de produção e caracterizar molecularmente essas estirpes.

Com o objetivo de contribuir com esse entendimento, nesse estudo foram utilizadas amostras de tecido de aves de produção de 32 origens diferentes. Para o diagnóstico molecular foram utilizadas amostras de timo, baço e, em alguns casos, soro tanto de frangos de corte como poedeiras comerciais de diferentes regiões do estado de Minas Gerais.

Conhecendo a importância social das produções de subsistência e muitas vezes sua proximidade com a avicultura industrial, tentou-se traçar um paralelo entre a presença do CAV nos dois tipos de produção. Esse estudo é interessante uma vez que as aves de subsistência não são vacinadas contra esse agente. Assim a presença de CAV nesse tipo de produção demonstra que de alguma maneira o vírus da avicultura comercial chegou aos plantéis de subsistência, alertando para o trânsito de agentes patogênicos entre os diferentes sistemas de produção. Para essa pesquisa foram avaliadas amostras de tecido de galinhas de subsistência

de 20 origens diferentes, de diversos pontos da região metropolitana de Belo Horizonte.

Uma lacuna observada na epidemiologia da anemia infecciosa das galinhas está relacionada à importância de outras espécies de aves na transmissão do CAV. Pensando nisso, foi pesquisada a presença do genoma de CAV em tecidos tanto de aves de produção como silvestres e exóticas. Foram avaliadas amostras de codornas, faisões, pombos, passeriformes, psitacídeos, um ganso, um cisne e um marreco de diferentes origens e com diferentes históricos, totalizando 16 amostras diferentes.

Uma outra dúvida levantada no nosso trabalho é a importância das vacinas na transmissão de CAV. Estudos sorológicos demonstram que o vírus está disseminado na avicultura de produção e uma das alternativas para essa realidade é a transmissão do agente através de imunobiológicos produzidos em ovos embrionados. Foram avaliadas vacinas de diferentes empresas da década de 90 e amostras recentes, totalizando 26 vacinas diferentes. Todas as vacinas utilizadas no estudo estavam lacradas tendo sido reconstituídas no momento da extração de DNA.

Como controle positivo de todos os testes realizados foi utilizada a vacina comercial AviPro Thymovac® da empresa *Lohman Animal Health*.

As amostras utilizadas no presente estudo foram armazenadas congeladas a -20°C , no setor de Doenças das Aves, do Departamento

de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

2. Extração de DNA total

Para a extração do DNA total foram comparados os métodos com DNAzol® (Invitrogen) e com sílica (BOOM *et al.*, 1990). Com base nos resultados das comparações, foi escolhido o método com sílica, por melhor quantidade e qualidade do DNA extraído. A padronização das extrações com sílica foi desenvolvida em colaboração com o Laboratório de Virologia Comparada do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob orientação do Prof. Maurício Resende.

2.2. Extração de DNA por sílica

A extração foi realizada através da reação do material bruto (200µl de suspensão de vacina ou volume equivalente de tecido macerado) com três volumes (600µl) de iodeto de sódio (NaI) sob aquecimento a 55°C e leve agitação por 15min.

O material obtido foi então submetido à centrifugação por 30 minutos a 16000g a temperatura ambiente e o sobrenadante coletado com o auxílio de uma pipeta.

Foram, a seguir, adicionados à mistura 50µl de suspensão de sílica (dióxido de silício – Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) e a nova mistura foi homogeneizada com o auxílio de um vortex. A mistura foi incubada em agitador *end-*

over-end (Speci-Mix, Thermolyne) por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação por 30 segundos a 16000g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado por inversão do tubo.

O sedimento foi ressuscitado em 1ml de NaI e rapidamente homogeneizado com o auxílio de um vortex. A mistura foi centrifugada por 30 segundos a 16000g a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado por inversão do tubo.

O sedimento foi lavado duas vezes com 1ml de tampão de lavagem (Etanol 50%, 50mM Tris-HCl pH8,0, 10mM EDTA pH 8,0). Após centrifugação por 30 segundos a 16000g a temperatura ambiente, todo o tampão de lavagem foi removido com o auxílio de uma pipeta.

Foi adicionado 1ml de acetona *pro analysi* e, após homogeneizado no vortex, e centrifugado por 30 segundos a 16000g a temperatura ambiente, o sobrenadante foi descartado e o resíduo de acetona evaporado do sedimento em tubo com tampa aberta mantido a 56°C por 10 minutos.

O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50µl de TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0), incubado a 50°C por 5 minutos e o tubo centrifugado por 30 segundos a 16000g a temperatura ambiente para solidificar o sedimento. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma pipeta e estocado em freezer a -20°C.

3. Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA

As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Este aparelho permite a análise e quantificação de amostras de ácido nucléicos utilizando 1µl da amostra de interesse. É ligado a um computador que analisa os dados enviados pelo aparelho e estima a quantidade de DNA na amostra em ng/µl e a qualidade do material pelo valor obtido na razão DO_{260nm}/DO_{280nm} .

4. Condições da reação em cadeia pela polimerase – *nested* (*nested* – PCR) para amplificação das regiões genômicas que codificam para a síntese de VP2 e VP3 do CAV.

O DNA total das amostras foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma de CAV pela *nested* – PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores externos e internos sugeridos por CARDONA *et al.* (2000).

Iniciadores externos

O3F: 5'-(CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG)-3'

O3R: 3'-(TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT)-5'

Iniciadores internos

N3: 5'-(CCA CCC GGA CCA TCA AC)-3'

N4: 3'-(GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C)-5'

4.1 PCR – específica (1ª reação – iniciadores externos)

Uma alíquota de cada amostra de DNA total foi utilizada como molde na primeira reação de amplificação, com volume final de 50µl contendo: 200ng de DNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 1µl de cada iniciador externo a 10µmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/µl (*Platinum*® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p.

A reação de PCR específica foi realizada em termociclador (Axygen - Maxygene). As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Para cada ensaio foi utilizado como controle positivo o DNA extraído da vacina comercial AviPro Thymovac® da empresa *Lohman Animal Health*. Foi utilizado também um controle negativo contendo todos os reagentes sem a inclusão de uma amostra de DNA.

4.2 *Nested* - PCR (2ª reação – iniciadores internos)

A reação de *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 PCR-específica, assim como o programa de amplificação.

5. Análise dos produtos amplificados pelos ensaios de PCR

A visualização dos resultados das amplificações foi realizada por eletroforese em gel de agarose.

Em cada 5µl do produto amplificado, foram adicionados 1µl do tampão corante de amostra (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol) na concentração de 5X, e essa mistura foi aplicada em gel de agarose a 1%. 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). Posteriormente à corrida, o gel foi corado com solução de brometo de etídeo na concentração de 0,5µg/µl e os resultados revelados com o auxílio de um transiluminador UV.

6. Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o “Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean – UP System” (Promega), segundo recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro (NanoDrop ND – 1000).

Para determinar a eficiência da purificação, 1µl de cada produto foi homogeneizado com 1µl de tampão corante de amostra e em seguida analisado por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X à temperatura ambiente sob voltagem constante de 100V.

O DNA purificado de cada amostra foi estocado a -20°C até ser utilizado para o sequenciamento.

7. Sequenciamento genético

O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et. al* (1997), em um sequenciador automático capilar (Mega Bace® 1000, HEALTHCARE), utilizando o Kit DyEnamic™ ET Dye Terminator (Amersham Bioscience) de acordo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

7.1 Reação de sequenciamento

Aproximadamente 80ng do produto de PCR purificado foram utilizados em cada reação de sequenciamento utilizando os iniciadores específicos de cada fragmento de DNA. Cada amostra foi sequenciada em ambas as direções da dupla fita, quantas vezes foi necessário, até ser obtido um resultado com alta taxa de certeza.

A reação de sequenciamento foi feita em placa de 96 poços, em termociclador (Eppendorf 96-well Mastercycler®), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 95°C por 25 segundos, anelamento do iniciador a 42°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 3 minutos, sendo esse ciclo repetido por 36 vezes. Em seguida, o produto da reação de sequenciamento foi purificado por precipitação utilizando acetato de amônio e etanol e homogeneizado em tampão de amostra.

Para a realização das reações de sequenciamento foi utilizado o sequenciador automático capilar Mega Bace® 1000 (HEALTHCARE) do Núcleo de Análise de Genoma e Expressão Gênica (NAGE) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

8. Análise computacional das sequências

8.1 Montagem e edição 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 Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), que aceita como critério de validação de qualidade somente as leituras que tenham pontuação de no mínimo 20 (EWING & GREEN, 1998). O sequenciamento de todas as repetições de cada amostra foi utilizado para a montagem e visualização da sequência consenso final utilizando a ferramenta CAP3 do Phred.

8.2 Busca das sequências similares em bancos de dados

Para início das análises, 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/>). Os algoritmos BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool*) desenvolvido pelo NCBI foi utilizado para a busca de similaridade entre os nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

8.3 Alinhamento das sequências

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e sequências inferidas de aminoácidos foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 3.1/ www.megasoftware.net) versão 3.1 para Windows e MultAlin

(<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.htm>)

l). Todos os alinhamentos foram revisados e editados manualmente quando necessário.

8.5 Análises filogenéticas

Os alinhamentos de nucleotídeos, dos genes que codificam para as proteínas VP2 e VP3 do genoma do CAV das amostras analisadas neste trabalho, foram utilizados para a construção de árvores filogenéticas com o auxílio do programa MEGA 3.1 (www.megasoftware.net). Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança da topologia (“bootstrap”) com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas.

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. 48:984-987, 1997.

BRENTANO, L., MORES, N., WENTZ, I., et al. *Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil*. Avian Dis. 35:793-800, 1991.

BOOM, R., SOL, C., BELD, M., WEEL, J., et al. *Improved silica – guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha – casein to silica particles*. J. Clin. Microbiol. 37:615-619, 1990.

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. 81:2067-2075, 2000.

EWING, B., GREEN, P. *Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities*. Gen. Res. 8:186-194, 1998.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings Nat. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1997.

CAPÍTULO III

ESTUDO FILOGENÉTICO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM MINAS GERAIS

[Phylogenetic analysis of chicken anemia virus in Minas Gerais - Brazil]

RESUMO

Quatorze estirpes do vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) foram sequenciadas, incluindo 7 de 32 obtidas de galinhas da avicultura industrial, 4 entre 11 de galinhas de subsistência, 2 de 28 presentes em vacinas comerciais e uma de ave da fauna (*Forpus xanthopterygius*). A caracterização genética foi por análise das variações encontradas na região do DNA que codifica para as proteínas VP2 e VP3 de CAV. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com sequências de estirpes de CAV de diferentes partes do mundo disponibilizadas no GenBank. As sequências nucleotídicas e de aminoácidos deduzidas foram alinhadas à sequência da estirpe padrão Cuxhaven-1, utilizada na produção de vacinas comerciais. Os resultados obtidos com a análise filogenética demonstraram que as estirpes do estudo apresentaram similaridade com isolados de várias partes do mundo, não apresentando relação geográfica, mas apresentaram variação discreta quando comparadas à estirpe Cuxhaven-1. As substituições de nucleotídeos não acarretaram mudança na sequência de aminoácidos inferida, com exceção da substituição na posição 153 da VP2 de um A→V, substituição previamente encontrada por outros autores e que parece associada à perda de tropismo pelas células de linhagem MSB-1. Até o momento um único sorotipo de CAV está descrito, assim não são esperadas grandes alterações, principalmente em genes que codificam para enzimas, como VP2 e VP3, nesses casos o esperado é que grande parte da molécula permaneça conservada para garantir a função protéica.

SUMMARY

Fourteen chicken anemia virus (CAV) strains were sequenced and analysed for phylogeny in Minas Gerais, Brazil. Sequenced strains including 7 out of 32 strains of the poultry industry, 4 out of 11 of free-range chickens, 2 out of 26 of commercial vaccines and one of a wild psittacine *Forpus xanthopterygius*. The genetic characterization was based on analysis for nucleotide variations in the DNA region coding for the VP2 and VP3 proteins. The obtained sequences were compared to the published sequences of Cuxhaven-1 (Cux-1) CAV prototype strain. The deducted amino acids sequences were aligned to the published amino acid composition for Cux-1. The nucleotide substitutions did not result in amino acid change, except for position 153 of the VP1, changed from alanine to valine, both nonpolar amino acids.

Such substitution has been considered in changes in the ability to produce cytopathic effect for MSB1 *in vitro*. All strains sequences were similar to CAV sequences published previously. The host's immune response or genetic diversity may impose selective forces for the emergence of amino acid changes in mutants, and may render a protein impaired for its biological function, hence the virus not viable, or may result in evolutive advantage and improved adaptation to the host cells.

INTRODUÇÃO

O vírus da anemia das galinhas (*Chicken anemia virus* – CAV) foi isolado pela primeira vez no Japão em 1979 (YUASA *et al.*, 1979). Desde então, sua presença tem sido descrita em criações comerciais em quase todo o mundo (SCHAT, 2003). O CAV pertence à família *Circoviridae*, sendo o único representante do gênero *Gyrovirus* (PRINGLE, 1999). É um vírus não envelopado com genoma de DNA fita simples circular de aproximadamente 2,3 Kb (TODD *et al.*, 1990). O genoma do CAV contém uma única região promotora/enhancer e três genes. Durante a infecção nas células alvo o CAV replica pela formação de um intermediário de DNA dupla fita. A partir desta molécula dupla fita um único mRNA transcrito codifica três proteínas distintas: VP1, VP2 e VP3 (NOTEBORN, 2004). A VP1 com 51,6 kDa é a proteína estrutural do capsídeo viral (NOTEBORN e KOCH, 1995). A VP2 com 24 kDa é uma fosfatase (PETERS *et al.*, 2002). A VP3 com 13,6 kDa, também chamada de apoptina, é uma forte indutora de apoptose em timócitos e células linfoblastóides de galinhas (NOTEBORN *et al.*, 1994). PETERS *et al.*, 2006, observaram que o trânsito de VP3 para o núcleo, pode ser alterado por VP2 mutadas. Assim a VP2 atua na fosforilação da VP3,

ativando-a e induzindo a apoptose celular. Dessa forma tanto a VP3 como a VP2 contribuiriam para a patogenicidade de estirpes de CAV (NOTEBORN, 2004).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a detecção do DNA do CAV de forma rápida e econômica. O sequenciamento e análise dos produtos da PCR permite estabelecer relações filogenéticas entre diferentes isolados e estirpes, auxiliando assim, o entendimento da biologia molecular e epidemiologia do agente.

Neste trabalho avaliaram-se as relações filogenéticas entre diferentes estirpes de CAV, tanto da avicultura industrial, como de aves de subsistência, vacinas e aves da fauna, disponibilizadas na rotina de diagnóstico do Setor de Doença das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais.

O CAV caracteriza-se pela alta resistência à inativação, transmissão vertical e horizontal e por produzir uma infecção persistente. A sua presença na avicultura industrial brasileira é reconhecida e pode ter se iniciado com a genética avícola e sementes de vacinas importadas contaminadas até o início dos anos 90 (BARRIOS *et al.*, submetido para publicação 2009a). A utilização de vacinas vivas pode ter disseminado o CAV para a avicultura de subsistência (BARRIOS *et al.*, submetido para

publicação 2009b). Criadas na proximidade de galináceas, aves da fauna como o *Forpus* estudado, poderiam abrigar o CAV o suficiente para permitir a sua detecção em PCR (BARRIOS *et al.*, submetido para publicação 2009c).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Nesse estudo foram utilizadas amostras (n=72) de tecido de aves da avicultura industrial de 32 origens diferentes, 11 origens diferentes de aves de subsistência (BARRIOS *et al.* submetido em 2009b), 26 vacinas de diversas empresas da década de 90 e atuais (BARRIOS, *et al.* submetido em 2009a) e uma de ave da fauna (BARRIOS *et al.* submetido em 2009c). Os tecidos coletados, timo e baço, foram armazenados em tubos de 1,5ml e mantidos a – 20°C para posterior processamento, as vacinas estavam lacradas e foram reconstituídas no momento da extração de DNA. Como controle positivo foi utilizada a vacina comercial AviPro Thymovac® da empresa *Lohman Animal Health*.

Tabela 1. Identificação das amostras positivas para CAV por *nested*-PCR utilizadas no estudo filogenético.

Amostra	Identificação
Aves industriais	BH15, BH18, BH121, BH58, BH67, BH68, BH206
Aves de subsistência	BH07, BH140, BH116, BH248
Ave da fauna	BH115
Vacinas comerciais	BH249, BH250

Extração de DNA total

A extração foi realizada pelo método descrito por BOOM *et al.* (1999), por reação do material bruto com iodeto de sódio (NaI) e captura do ácido nucléico em partículas de sílica (dióxido de silício – Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50µl de TE (5mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0) e estocado em freezer a -20°C. As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura (260-280nm) em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000).

Nested- PCR

O DNA total extraído de cada amostra, foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma de CAV pela *nested* – PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores externos e internos descritos previamente (CARDONA *et al.*; 2000), respectivamente, O3F: 5'-(CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG)-3' e O3R: 3'-(TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT)-5' e N3: 5'-(CCA CCC GGA CCA TCA AC)-3' e N4: 3'-(GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C)-5'. Na primeira reação de amplificação, com volume final de 50µl foram utilizados 200ng de DNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP – Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 1µl de cada iniciador externo a 10µmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/µl (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen)

e água ultra pura q.s.p. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. A reação de *nested*-PCR foi realizada com reagentes, concentrações e programa de amplificação empregados na primeira reação, exceto para o produto da primeira reação como DNA molde e 1µl de cada um dos oligonucleotídeos internos a 10pmol. Para cada ensaio foram utilizados, como controle positivo, o DNA extraído da vacina comercial AviPro Thymovac® da empresa *Lohman Animal Health* e como controle negativo, a mistura de todos os reagentes exceto o molde de DNA. A visualização dos resultados das amplificações (produto de 388pb na primeira reação e 211pb na segunda reação) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico) corado com brometo de etídeo e visualizado com o auxílio de um transiluminador UV.

Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos amplificados foram purificados utilizando o “Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean – UP System” (Promega), segundo recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro (NanoDrop ND – 1000). Para determinar a eficiência da purificação, 1µl de cada produto foi

homogeneizado com 1µl de tampão corante de amostra e em seguida analisado por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X à temperatura ambiente sob voltagem constante de 100V. O DNA purificado de cada amostra foi estocado a –20°C até ser utilizado para o sequenciamento.

Sequenciamento genético

O sequenciamento foi realizado pelo método de dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et. al* (1977), em um sequenciador automático capilar (Mega Bace® 1000, HEALTHCARE), utilizando o Kit DyEnamic™ ET Dye Terminator (Amersham Bioscience) de acordo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Aproximadamente 80ng do produto de PCR purificado foram utilizados em cada reação de sequenciamento utilizando os iniciadores específicos de cada fragmento de DNA. Cada amostra foi sequenciada em ambas as direções da dupla fita, quantas vezes foi necessário, até ser obtido um resultado com alta taxa de certeza. As reações foram realizadas em termociclador (Eppendorf 96-well Mastercycler®), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 95°C por 25 segundos, anelamento do iniciador a 42°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 3 minutos, sendo esse ciclo repetido por 36 vezes.

Análise computacional das sequências

Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa Phred (<http://asparagin>.

cenargen.embrapa.br/phph/). O sequenciamento de todas as repetições de cada amostra foi utilizado para a montagem e visualização da sequência consenso final utilizando a ferramenta CAP3 do Phred. 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/>). Os algoritmos BLASTn e BLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool*) desenvolvido pelo NCBI foi utilizado para a busca de similaridade entre os nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Alinhamento das sequências

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e sequências inferidas de aminoácidos foram feitos com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no programa *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* (MEGA 3.1/ www.megasoftware.net) versão 3.1 para Windows e MultAlin (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>).

Análises filogenéticas

Os alinhamentos de nucleotídeos e aminoácidos, do gene que codifica para a proteína VP2 do genoma do CAV das amostras analisadas neste trabalho, foram utilizados para a construção de árvores filogenéticas com o auxílio do programa MEGA 3.1 (www.megasoftware.net). Neste mesmo programa, os dados foram submetidos ao teste de confiança da topologia (“bootstrap”)

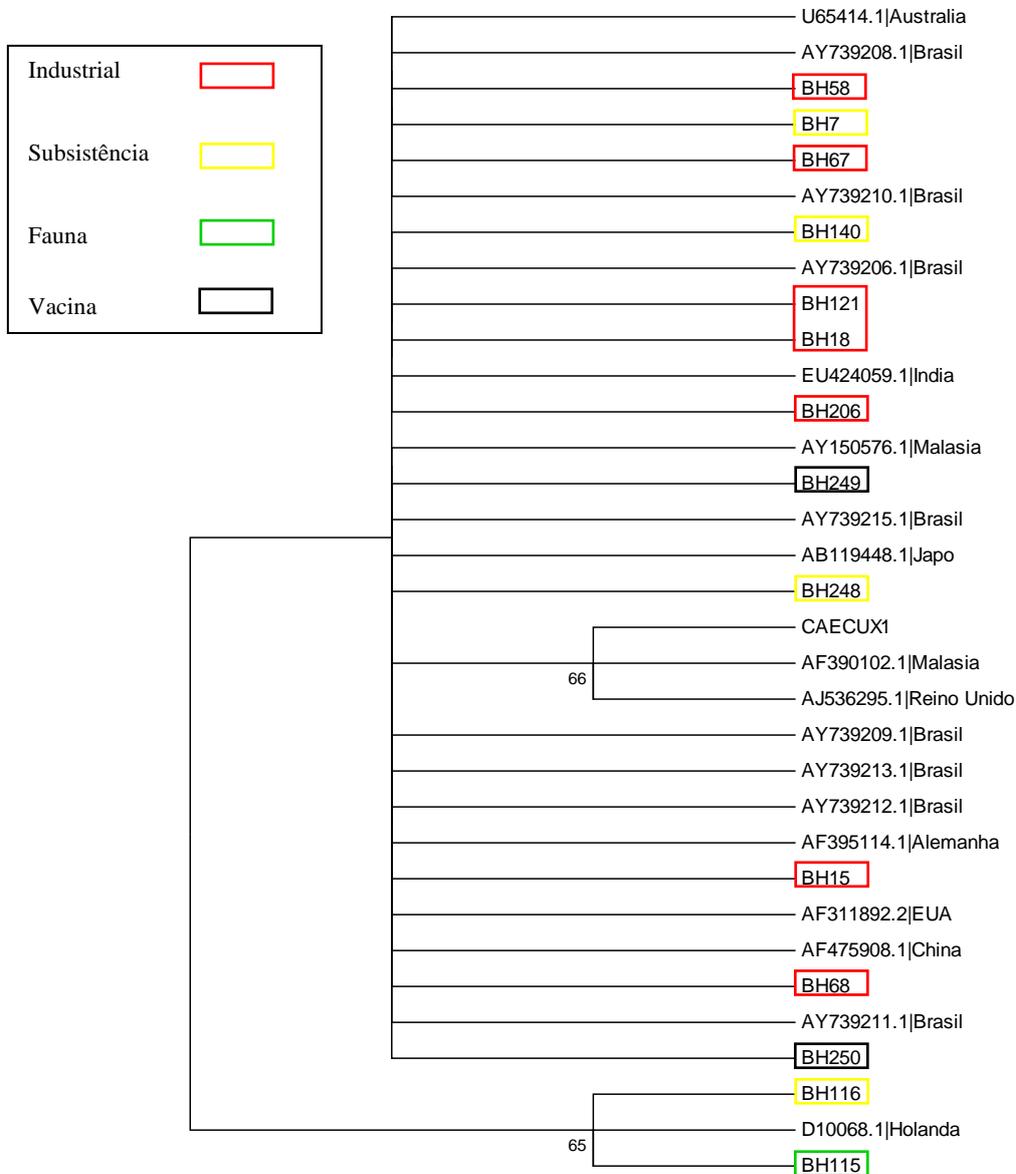
com 1000 reamostragens, para testar o grau de confiabilidade dos agrupamentos obtidos nas árvores filogenéticas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisadas sequências de CAV de 7 amostras de galinhas da avicultura industrial, 4 de galinhas de subsistência, 2 encontradas em vacinas comerciais e uma obtida de ave da fauna, testadas para CAV por *nested*-PCR e que apresentaram o perfil eletroforético esperado. Demonstrou-se alta qualidade dos eletroferogramas das 14 amostras positivas por *nested* – PCR e que foram sequenciadas. Atribui-se esses resultados à utilização de pares de iniciadores altamente específicos (CARDONA *et al.*, 2000) e na amplificação de enzima polimerizadora de alta fidelidade. 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 da árvore filogenética foram escolhidas sequências depositadas no GenBank de estirpes de CAV originárias de regiões distintas, geograficamente distantes em diferentes continentes, na tentativa de estabelecer alguma relação geográfica entre as sequências obtidas nesse estudo e aquelas depositadas (Fig.1).

Figura 1. Análise filogenética da região do genoma de CAV que codifica para as proteínas VP2 e VP3.



Nota: Análises realizadas pelo método *neighbor-joining* utilizando o programa *Phylogenetic and Molecular Evolutionary Analyses* (MEGA version 3.1).

Os resultados obtidos não permitiram estabelecer relação geográfica entre as seqüências das estirpes avaliadas e as seqüências de CAV de diferentes partes do

mundo, concordando com os achados de NOGUEIRA *et al.* (2007). FARKAS *et al.* (1996) descreveram previamente resultados similares e sugeriram que as alterações pontuais

poderiam estar concentradas em regiões não codificadoras do genoma, e que a estabilidade genética poderia estar relacionada à manutenção da função protéica (enzimática).

Considerando-se que apenas um sorotipo de CAV é conhecido, espera-se conservação genética na região codificadora das proteínas VP1, VP2 e VP3 entre as sequências genômicas de diferentes estirpes de CAV (MCNULTY, *et al.*, 1990), apesar da existência de vários grupos genéticos com diferentes patogenicidades (ISLAM, *et al.*, 2002). Entretanto, SPACKMAN *et al.* (2002 a e b), encontraram diferenças antigênicas em uma estirpe de CAV, sugerindo a existência de um segundo sorotipo de CAV e ressaltou a importância de estudos epidemiológicos para entender a distribuição de CAV no mundo.

O uso de vacinas atenuadas na avicultura industrial, falhas na biossegurança e a alta resistência viral poderiam ser responsáveis pela ampla distribuição de CAV nos plantéis. A comparação das sequências obtidas nesse estudo com uma sequência referência utilizada na produção de vacinas demonstrou uma alta similaridade tanto na sequência de nucleotídeos quanto na de aminoácidos (Fig 2 e 3). Indicando que o CAV presente tanto na avicultura industrial, como na avicultura de subsistência,

nas vacinas comerciais da década de 90 e na ave da fauna devem possuir uma origem próxima.

As comparações dos alinhamentos de nucleotídeos com as sequências deduzidas de aminoácidos demonstram que apesar das estirpes BH115 e BH116 apresentarem pequena diferença na sequência de nucleotídeos, que acarretou a inclusão dessas em um ramo diferente da árvore filogenética, formando um novo agrupamento, essa alteração não acarretou mudança de aminoácido. As estirpes avaliadas apresentaram uma única substituição de aminoácido de A (alanina) para V (valina) na posição 153 (VP2), ambos aminoácidos apolares. Os codons para alanina são GCU, GCC, GCA e GCG e para valina GUU, GUC, GUA e GUG. RENSHAW *et al.* (1996) e NOGUEIRA *et al.* (2007), encontraram a mesma substituição de aminoácido na mesma posição de VP2 e relacionou essa alteração à perda de tropismo de CAV pelas células de linhagem MSB-1. Esse resultado reforça a indicação de testes moleculares para o diagnóstico de CAV, uma vez que amostras circulantes poderiam não ser isoladas em cultivo celular.

Figura 2: Alinhamento de nucleotídeos das amostras positivas para CAV em comparação com sequência depositada no GenBank de Cuxhaven-1, estirpe utilizada em vacinas comerciais.

	261											379
CUX1	CTCGAAGAAG	CGATCCTGCG	ACCCCTCCGA	GTACAGGGTA	AGCGAGCTAA	AAGAAAAGCTT	GATTACCACT	ACTCCCAGCC	GACCCCGAAC	CGCAA AA AGG	CGTATAAGAC	TGTAAGATG
BH249G.....	T.....
BH18G.....	T.....
BH15G.....	T.....
BH248G.....	T.....
BH7G.....	T.....
BH121G.....	T.....
BH250G.....	T.....
BH58G.....	T.....
BH206G.....	T.....
BH67G.....	T.....
BH68G.....	T.....
BH116A.....G.....	T.....
BH115A.....G.....	T.....
BH140G.....	T.....

Figura 3: Alinhamento de aminoácidos da VP2 das amostras positivas para CAV em comparação com sequência depositada no GenBank de Cuxhaven-1, estirpe utilizada em vacinas comerciais.

CUX1	QGKRAKRKLD	YHYSQPTPNR	KK A YKTVRWQ
BH249V.....
BH18V.....
BH15V.....
BH248V.....
BH250V.....
BH58V.....
BH7V.....
BH121V.....
BH67V.....
BH206V.....
BH68V.....
BH116V.....
BH115V.....
BH140V.....
ConsensusV.....

Variações genômicas em CAV foram detectadas também por outros autores. SCOTT *et al.* (2001) avaliaram estirpes atenuadas resistentes à neutralização com anticorpos monoclonais específicos à estirpe Cuxhaven-1 de CAV, e sugeriram que a atenuação observada poderia estar associada à alterações na região C-terminal de VP2 e VP3. PETERS *et al.* (2007) atenuaram estirpes de CAV através de mutações sitio dirigidas no gene que codifica para a VP2, demonstrando que a VP2 é importante para a patogenicidade de CAV. FARKAS *et al.* (1996) haviam encontrado mudanças de posições de seis aminoácidos na porção C-terminal de VP3 e quatro alterações na porção C-terminal de VP2. Este estudo indicou ainda que metade da região N-terminal de VP3 e três quartos da região N-terminal da VP2 são conservadas e que isso poderia estar relacionado à manutenção da função protéica, no entanto não realizou nenhum estudo de comparação de patogenicidade entre as diferentes estirpes. As funções enzimáticas exercidas por VP2 e VP3 são essenciais, respectivamente, à montagem das novas gerações do vírion e desvio da função genética celular para a replicação do CAV, que resulta em morte celular programada.

A existência de sorotipo único de CAV poderia sugerir conservação na composição de aminoácidos, especialmente importante para a conservação das funções biológicas das proteínas. A alteração observada nesse estudo parece não acarretar alterações na função protéica uma vez que um aminoácido neutro foi substituído por outro de mesmo caráter.

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. 48:984-987, 1997.
- BARRIOS, P. R., GÓMEZ, S. Y. M., RESENDE, M., et al. *Presença do vírus da anemia das galinhas em vacinas avícolas comerciais vivas no Brasil*. 2009a.
- BARRIOS, P. R., GÓMEZ, S. Y. M., RESENDE, M., et al. *Ocorrência do vírus da anemia infecciosa das galinhas na avicultura de subsistência da região metropolitana de Belo Horizonte, Minas Gerais*. 2009b.
- BARRIOS, P. R., GÓMEZ, S. Y. M., RESENDE, M., et al. *Molecular diagnosis of chicken infectious anemia virus infection in Blue-Winged Parrotlet *Forpus xanthopterygius**, 2009c.
- 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. 37:615–619, 1999.
- 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. 81:2067–2075, 2000.
- FARKAS, T., TANAKA, A., KAI, K., et al. *Cloning and sequencing of the genome of chicken anaemia virus (CAV) TK-5803 strain and comparison with other CAV strains*. J. Vet. Med. Sci. 58:681–684, 1996.
- ISLAM, M. R., JOHNE, R., RAUE, R., et al. *Sequence analysis of the full-length cloned DNA of a chicken anaemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence for genetic grouping of CAV strains based on the deduced VP1 amino*

- acid sequences.* J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 49:332–337, 2002.
- MCNULTY, M. S., CONNOR, T. J., MCNEILLY, F., et al. *Preliminary characterisation of isolates of chicken anaemia agent from the United Kingdom.* Avian Pathol, 19:67–73, 1990.
- 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., Microbiol. Infect. Dis. 30:81–96, 2007.
- NOTEBORN, M. H. M. *Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms.* Vet. Microbiol. 98:89-94, 2004.
- NOTEBORN, M. H. M., KOCH, G. *Chicken anemia infection: Molecular basis of pathogenicity.* Avian Pathol. 24:11-31, 1995.
- NOTEBORN, M. H. M., TODD, D., VERSCHUEREN, C. A. J., et al. *A single chicken anaemia virus protein induces apoptosis.* J Virol, 68:346–51, 1994.
- PETERS, M. A., CRABB, B. S., TIVENDALE, K., et al. *Attenuation of chicken anemia virus by site-directed mutagenesis of VP2.* J. Gen. Virol. 88:2168–2175, 2007.
- 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. 87:823–831, 2006.
- PETERS, M. A., JACKSON, D. C., CRABB, B. S., et al. *Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase.* J Biol Chem, 277:39566–73, 2002.
- PRINGLE, C. R. *Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia.* Arch. Virol. 144:2065-2070, 1999.
- 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 70:8872–8878, 1996.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proceedings Nat. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1997.
- SCHAT K.A. *Infectious anemia.* In: Saif Y.M., Barnes H.J, Fadly A.M., Clisson J.R., McDougald L.R. & Swayne D.E. Diseases of Poultry. Ames Iowa State University 2003. 11. ed., p.182-202.
- SCOTT, A. N., MCNULTY, M. S., TODD, D. *Characterisation of a chicken anaemia virus variant population that resists neutralisation with a group-specific monoclonal antibody.* Arch Virol. 146:713–728, 2001.
- SPACKMAN, E., CLOUD, S. S., POPE, C. R., et al. *Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anaemia virus with a prototypical isolate I. Pathogenesis.* Avian Dis. 46:945–955, 2002a.
- SPACKMAN, E., CLOUD, S. S., POPE, C. R., et al. *Comparison of a putative second serotype of chicken infectious anaemia virus with a prototypical isolate II. Antigenicity.* Avian Dis. 46: 955–960, 2002b.
- TODD, D., CREELAN, J. L., MACKIE, D. P., et al. *Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent.* J Gen Virol, 71:819–23, 1990.
- YUASA, N., TANIGUCHI, T., YOSHIDA, I. *Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks.* Avian Dis. 23:366-385, 1979.

CAPÍTULO IV

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA DAS GALINHAS EM *Forpus xanthopterygius* – PERIQUITO TUIM

[Molecular diagnosis of chicken anemia virus infection in Blue-Winged Parrotlet Forpus xanthopterygius]

RELATO DE CASO

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) foi primeiramente descrito no Japão (YUASA *et al.*, 1979), em galinhas jovens com anemia e atrofia de timo e medula óssea, e desde então tem sido descrito em todo o mundo (SCHAT, 2003), incluindo o Brasil (BRENTANO *et al.*, 1991). O CAV pertence à família *Circoviridae*, gênero *Gyrovirus* (PRINGLE, 1999), contém genoma de DNA fita simples circular e é não envelopado (TODD *et al.*, 1990). É transmitido tanto vertical como horizontalmente (ROSENBERGER & CLOUD, 1989) e a galinha é o único hospedeiro conhecido (TODD, 2004). Estudos epidemiológicos em todo o mundo indicam que o CAV está amplamente distribuído em galinhas e frangos-de-corte industriais. No Brasil, estudos em aves de produção demonstraram índices de 92% (BRENTANO *et al.*, 2000), 100% (CANAL *et al.*, 2004) e 97.2% (GOMES *et al.*, 2005) para sorologia positiva.

O *nested* – PCR para a detecção do DNA de CAV é uma ferramenta que demonstra sensibilidade maior que o PCR convencional (IMAI, *et al.*, 1998; CARDONA *et al.*, 2000; SIMIONATTO *et al.*, 2005).

Nesse estudo foram avaliadas amostras de baço

e timo de aves silvestres, incluindo os psitacídeos nativos papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), papagaio-de-peito-roxo (*Amazona vinacea*), arara-azul (*Anodorhynchus hyacinthinus*), papagaio-do-mangue (*Amazona amazonica*), arara-canindé (*Ara ararauna*), ararajuba (*Guarouba guarouba*), aratinga-sol (*Aratinga solstitialis*), maitaca-roxa (*Pionus fuscus*), jandaia verdadeira (*Aratinga jandaya*), aratinga-áurea (*Aratinga aurea*), marianinha (*Pionites leucogaster*), periquito-maracanã (*Aratinga leucophthalma*) e tuim (*Forpus xanthopterygius*), os psitacídeos exóticos Ring-neck (*Psittacula krameri*) e agapornis de Fischer (*Agapornis fischeri*), os Passeriformes nativos, canário da terra (*Sicalis flaveola*) e exótico canário-Belga (*Serinus canaria*), os Falconiformes nativos, quiri-quiri (*Falco sparverius*), gavião-carijó (*Rupornis magnirostris*), carcará (*Caracara plancus*) e urubú (*Coragyps atratus*) e Columbiformes, pombo doméstico (*Columba livia* outras espécies que não galinhas não tem sido realizada e o papel de outras espécies na *formadomestica*), todos órgãos obtidos de aves que vieram a óbito em triagem ou óbitos de aves criatórios conservacionistas. A extração do DNA total dos tecidos foi realizada pelo método

descrito por BOOM *et al.* (1990) e estocado em freezer a -20°C. As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000. Para a *nested* - PCR foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores externos e internos descritos previamente por CARDONA *et al.* (2000). Iniciadores externos: O3F: 5'-(CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG)-3' e O3R: 3'-(TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT)-5'. Iniciadores internos: N3: 5'-(CCA CCC GGA CCA TCA AC)-3' e N4: 3'-(GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C)-5'. Na primeira reação de amplificação, com volume final de 50µl foram utilizados: 200ng de DNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 1µl de cada iniciador externo a 10µmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/µl (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A reação de *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 10µmol. 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® da empresa Lohman Animal Health. Foi utilizado também um controle negativo contendo todos os reagentes sem a inclusão de uma amostra de DNA. A visualização dos resultados das amplificações (produto de 388pb na primeira reação e 211pb na segunda reação) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico) corado com brometo de etídeo e visualizado com o auxílio de um transiluminador UV.

As amostras testadas apresentaram o perfil eletroforético esperado, tanto na primeira quanto na segunda amplificação. Para a confirmação dos resultados obtidos por *nested*-PCR, foi realizada a avaliação da sequência de nucleotídeos do produto gerado, para isso, os produtos amplificados foram purificados utilizando o “Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean – UP System” (Promega), segundo recomendações do fabricante. Após a purificação, as amostras foram quantificadas por leitura em espectrofotômetro (NanoDrop ND – 1000). Para determinar a eficiência da purificação, 1µl de cada produto foi homogeneizado com 1µl de tampão corante de amostra e em seguida analisado por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X à temperatura ambiente sob voltagem constante de 100V. O DNA purificado de cada amostra foi estocado a -20°C até ser utilizado para o sequenciamento. O sequenciamento foi realizado pelo método de

dideoxinucleotídeos, descrito por SANGER *et al.* (1977), em um sequenciador automático capilar (Mega Bace® 1000, HEALTHCARE), utilizando o Kit DyEnamic™ ET Dye Terminator (Amersham Bioscience) de acordo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Aproximadamente 80ng do produto de PCR purificado foram utilizados em cada reação de sequenciamento utilizando os iniciadores específicos. Cada amostra foi sequenciada em ambas as direções da dupla fita, quantas vezes foi necessário, até ser obtido um resultado com alta taxa de certeza. A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador (Eppendorf 96-well Mastercycler®), utilizando o seguinte ciclo: desnaturação a 95°C por 25 segundos, anelamento do iniciador a 42°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 3 minutos, sendo esse ciclo repetido por 36 vezes. Para análise da qualidade das bases de nucleotídeos dos eletroferogramas, obtidos pelo sequenciamento das fitas senso e anti-senso, foi utilizado o programa Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). O sequenciamento de todas as repetições de cada amostra foi utilizado para a montagem e visualização da sequência consenso final utilizando a ferramenta CAP3 do Phred. 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/>). O algoritmo BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) do pacote BLAST 2.0 (*Basic Alignment Search Tool*) desenvolvido pelo

NCBI foi utilizado para a busca de similaridade entre os nucleotídeos (ALTSCHUL *et al.*, 1997).

Confirmou-se que a sequência gerada nesse estudo (amplicon de DNA obtido de tuim) apresentou similaridade unicamente com sequências de CAV depositadas no GenBank, confirmando dessa maneira os resultados obtidos na *nested*-PCR. O tuim era de criatório comercial em que, juntamente com as aves nativas, criam-se galinhas em condições de proximidade e com intercâmbio de tratadores e fômites. A avaliação anatomopatológica do tuim desse estudo demonstrou um quadro de hemorragia generalizada com a presença de vesículas hemorrágicas na moela, rins aumentados de volume e grande infecção por *Blastocystis* no lúmen intestinal. Os resultados obtidos alertam para a necessidade de maiores estudos quanto à ocorrência de CAV em espécies de aves em convívio com galinhas. A eventual relevância de CAV necessita ser determinada na espécie *Forpus xanthopterygius*. Entretanto, não parecem ser importantes as espécies nativas, tendo em vista que a maioria das espécies estudadas terem resultado negativas. Este é o primeiro relato de detecção do genoma de CAV em ave da fauna. Vários vírus da família *Circoviridae* vem sendo detectados em aves associado a diferentes patologias, incluindo o vírus da doença do bico e da pena de psitacídeos (PBFDV), circovirus de pombo (PiCV) e vários agentes parecidos com circovirus em canários, pombas, gaivotas, avestruz e gansos (TODD, 2000). No entanto o CAV é um membro um pouco diferente, possui

genoma ligeiramente maior que os demais e organização gênômica distinta, sendo o único representante do gênero *Gyrovirus*.

Neste estudo molecular a sequência obtida apresentou identidade de nucleotídeos unicamente com CAV, não apresentando homologia com nenhum outro membro da família *Circoviridae*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOOM, R., SOL, C., BELD, M., WEEL, J., et al. *Improved silica – guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha – casein to silica particles*. J. Clin. Microbiol. 37:615–619, 1990.

BRENTANO, L., MORES, N., WENTZ, I., et al. *Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil*. Avian Dis. 35:793–800, 1991.

BRENTANO L., SILVA B. G., SAYD S., et al. *Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte do Brasil*. Revta Bras. Ciênc. Avícola 2:157-179, 2000.

CANAL, C. W., FERREIRA, D. J., MACAGNAN, M., et al. *Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in southern Brazil*. Pesq. Vet. Bras. 24:89-92, 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. 81:2067–2075, 2000.

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*. XVI Encontro Nacional de Virologia, Campos do Jordão, São Paulo, 2005.

IMAI, K., MASE, M., YAMAGUCHI, S., et al. *Detection of chicken anemia virus from formalin-fixed tissues by polymerase chain reaction*. Res. Vet. Sci. 64:205–208, 1998.

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

ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. *The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA)*. Avian Dis. 33:753–9, 1989.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings Nat. Acad. Sci. USA 74:5463-5467, 1997.

SCHAT K.A. *Infectious anemia*. In: Saif Y.M., Barnes H.J, Fadly A.M., Clisson J.R., McDougald L.R. & Swayne D.E. *Diseases of Poultry*. Ames Iowa State University 2003. 11. ed., p.182-202.

SIMIONATTO, S., LIMA-ROSA, C. A. V., RUBIN, L. L., et al. *Um protocolo de “nested-pcr” para detecção do vírus da anemia das galinhas*. Pesq. Vet. Bras. 25:106-110, 2005.

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

TODD, D. *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. Avian Pathol. 29:373–394, 2000.

TODD, D., CREELAN, J. L., MACKIE, D. P., et al. *Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent*. J Gen Virol, 71:819–23, 1990.

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

CAPÍTULO V

DETECÇÃO DO GENOMA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM VACINAS AVÍCOLAS COMERCIAIS NO BRASIL

[Detection of chicken anemia virus genome in commercial poultry virus vaccines in Brazil]

RESUMO

Vacinas comerciais para a avicultura industrial produzidas nas décadas de 90 e atual foram avaliadas para a contaminação com o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV). A investigação objetivou estabelecer a potencial correlação entre a presença do CAV em imunobiológicos e sua ampla distribuição na avicultura brasileira. Foram avaliadas 26 vacinas comerciais produzidas por diferentes laboratórios. O CAV foi detectado em cinco vacinas, incluindo de produção embrionária (contra a doença de Newcastle e encefalomielite aviária) e de cultivo primário (doença de Marek), todas da década de 90 (1991-1996) e em nenhuma da década atual. A presença do CAV em vacinas vivas comerciais para a avicultura foi considerada decisiva para a alta disseminação do vírus tanto para as aves da avicultura industrial, como da avicultura de subsistência e eventualmente aves da fauna.

SUMMARY

Commercial vaccines produced for the poultry industry during the 90 and present decades were evaluated for the contamination with chicken anemia virus (CAV). Twenty-six vaccines of different manufacturers were evaluated by nested-PCR. Five vaccines were positive for CAV, all produced in the 90's (1991-1996), including embryonic viruses (Newcastle disease, avian encephalomyelitis) and primary cell monolayer vaccine (HVT against Marek's disease). The contaminated vaccines could also have been available for the free-range chickens. No recently produced vaccine was positive for CAV. The findings of CAV contaminated vaccines were considered decisive for the widespread occurrence of CAV in the brazilian poultry industry and, including free-range chickens and eventual avian fauna, may have shaped the pattern of its epidemiology.

INTRODUÇÃO

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (*Chicken anemia virus* – CAV) foi isolado pela primeira vez no Japão em 1979 (YUASA *et al.*, 1979). Desde então, sua presença tem sido descrita em criações comerciais em quase todo

o mundo (SCHAT, 2003). No Brasil o primeiro isolamento foi realizado por BRENTANO *et al.* (1991). O CAV pertence à família *Circoviridae*, sendo o único representante do gênero *Gyrovirus* (PRINGLE, 1999), altamente resistente à desinfecção (TODD, 2000), não

envelopado e com genoma de DNA fita simples circular de aproximadamente 2,3 Kb (TODD *et al.*, 1990) que codifica para três proteínas distintas, a VP1 (51,6 kDa), a proteína estrutural do capsídeo viral (NOTEBORN e KOCH, 1995), VP2 (24 kDa), uma fosfatase (PETERS *et al.*, 2002) e VP3 (13,6 kDa), a apoptina, forte indutora de apoptose em tímócitos e células linfoblastóides de galinhas (NOTEBORN *et al.*, 1994).

Diferentes estudos detectaram CAV em plantéis de aves livre de patógenos específicos (SPF - *Specific Pathogen Free*), que eram mantidas em um programa rígido de biossegurança (CARDONA *et al.*, 2000, KULKARNI e FADLY, 2003). Plantéis SPF são muito utilizados por empresas farmacêuticas para a produção de imunobiológicos produzidos em ovos embrionados. Na avicultura muitas das vacinas comercializadas são produzidas por passagens consecutivas em ovo embrionado. Esses plantéis são testados constantemente para a presença de diferentes agentes, porém como na década de 90 muitas empresas não testavam seus lotes para CAV, resolvemos testar vacinas de diferentes empresas na tentativa de isolar CAV.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram avaliadas partidas vacinais de diferentes laboratórios, produzidas na década de 90 e recentes, totalizando 26 amostras diferentes. Todas as vacinas utilizadas no estudo estavam conservadas a -20°C e lacradas tendo sido

reconstituídas no momento da extração de DNA. Como controle positivo foi utilizada a vacina comercial AviPro Thymovac® da empresa Lohman Animal Health. As amostras utilizadas no presente estudo foram armazenadas no setor de Doenças das Aves, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Extração de DNA total

A extração foi realizada pelo método descrito por BOOM *et al.* (1999), através da reação do material bruto com iodeto de sódio (NaI) e adesão do ácido nucléico extraído em partículas de sílica (dióxido de silício – Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo). O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50 μl de TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0) e estocado em freezer a -20°C . As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

Nested- PCR

O DNA total extraído de cada amostra foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma de CAV pela *nested*-PCR. Foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores externos e internos descritos previamente por CARDONA *et al.*, 2000, respectivamente, O3F: 5'-(CAA GTA ATT TCA AAT GAA CG)-3' e O3R: 3'-(TTG CCA TCT TAC AGT CTT AT)-5' e N3: 5'-(CCA CCC GGA CCA TCA AC)-3' e N4: 3'-(GGT CCT CAA GTC CGG CAC ATT C)-5'. Na

primeira reação de amplificação, com volume final de 50µl foram utilizados 200ng de DNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 1µl de cada iniciador externo a 10pmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/ml (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 10 minutos. A reação de *nested*-PCR foi realizada com reagentes, concentrações e programa de amplificação empregados na primeira reação, exceto para o produto da primeira reação como DNA molde e 1µl de cada um dos oligonucleotídeos internos a 10pmol. Para cada ensaio foram utilizados, como controle positivo, o DNA extraído da vacina comercial AviPro Thymovac® (*Lohman Animal Health*) e como controle negativo, a mistura de todos os reagentes exceto o molde de DNA. A visualização dos resultados das amplificações (produto de 388pb na primeira reação e 211pb na segunda reação) foi obtida por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico) corado com brometo de etídeo e visualizado com o auxílio de um transiluminador UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 26 amostras testadas por *nested*-PCR, cinco apresentaram o padrão eletroforético esperado para CAV, tanto na primeira reação quanto na segunda. À tabela 1 apresentam-se os detalhes das amostras e resultados obtidos nesse estudo.

Tabela 1: Pesquisa de CAV por *nested*-PCR em vacinas avícolas comerciais.

Mês/Ano ¹	Agente vacinal ²	Laboratório ³	Resultado
Jan/91	Newcastle	A	Positivo
Mai/92	Newcastle	A	Positivo
Jan/94	Encefalomielite	A	Positivo
Fev/96	Marek	B	Positivo
Jul/96	Marek	C	Positivo
Dez/91	Bronquite	C	Negativo
Dez/92	Bronquite	B	Negativo
Jan/95	Bronquite	H	Negativo
Set/97	Bronquite	B	Negativo
Set/97	Bronquite	B	Negativo
Nov /98	Gumboro	B	Negativo
Dez /98	Gumboro	B	Negativo
Dez/98	Bronquite	B	Negativo
Set/01	Bronquite	F	Negativo
Fev/02	Bronquite	D	Negativo
Mai/04	SQP ⁴	C	Negativo
Jul/04	Gumboro	C	Negativo
Jul/04	Newcastle	C	Negativo
Ago/04	Bronquite	C	Negativo
Nov/04	Newcastle	D	Negativo
Mar/05	Bronquite	D	Negativo
Mai/05	Encefalomielite	C	Negativo
Jun/05	Newcastle	E	Negativo
Ago/05	Newcastle	D	Negativo
Ago/05	Encefalomielite e boubá aviária	G	Negativo
Set/05	Bronquite/Coriza/SQP ⁴	D	Negativo

Notas: 1. Data da fabricação; 2. Agente etiológico da vacina comercial; 3. Principais laboratórios fabricantes de vacinas aviárias no Brasil, codificados de A a H; 4. Vacina inativada e em emulsão oleosa.

Pelos resultados apresentados na tabela, pode-se perceber que a contaminação de vacinas vivas comerciais ocorreu até 1996 no Brasil. Nenhuma vacina mais recente apresentou contaminação por CAV detectável, incluindo laboratórios previamente positivos, indicando uma melhora sanitária dos plantéis de galinhas livres de patógenos específicos (SPF, do inglês *specific pathogen free*).

Durante a década de 90 houve grande avanço em metodologias de diagnóstico e de pesquisa em CAV, incluindo ensaios rápidos, altamente específicos e sensíveis, como os imunoenzimáticos (ELISA) e moleculares (PCR). Com os novos métodos de diagnóstico procedeu-se sua erradicação de CAV dos plantéis SPF. Assim, os plantéis SPF destinadas à produção de insumos para imunobiológicos atingiram, apenas durante os anos de 90, o status de qualidade como isentos de CAV. Obviamente, como galinhas adultas apresentam infecção subclínica e por transmitirem verticalmente CAV, torna-se fundamental o teste regular destes plantéis para monitoração do status para CAV.

Neste período ocorreu também grande transformação no mercado de vacinas, com a entrada de novas empresas, incorporações e fusões que podem ter promovido maior dinamismo e modernização ao setor. Os avanços foram também significativos nas normas técnicas e recomendações de agências internacionais (OIE - *Office International des Epizooties*, Organização Mundial de Saúde Animal) e nacionais (Ministério da Agricultura) e certificações de qualidade de boas práticas de

diagnóstico. A certificação e registro de imunobiológicos, incluindo os procedimentos de diagnóstico, passaram no Brasil por normalização que exigiu adequação de todos os envolvidos com o setor avícola. O Sistema de Vigilância Agropecuária Internacional-VIGIAGRO, a Secretaria de Defesa Animal e o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), com as exigências do mercado avícola internacional, em que o Brasil tem posição privilegiada como exportador, passaram neste período a ser exigidos como fiadores da qualidade sanitária.

Todas as vacinas examinadas foram produzidas com insumos de plantéis SPF, em embriões ou em monocamadas de células (fibroblastos) cultivadas *in vitro* para a replicação viral. Duas das vacinas positivas contra a doença de Marek são derivadas da estirpe HVT FC126 replicada em fibroblastos. As estirpes vacinais contra a doença de Newcastle (LaSota) e Encefalomielite (Van Roekel), são replicadas em ovos SPF embrionados. Três aspectos podem ter sido determinantes da contaminação por CAV nas vacinas (1) presença da infecção nos reprodutores SPF geradores de embriões, (2) falta de monitoração específica para CAV nos plantéis SPF e (3) a falta de controle de qualidade da vacina produzida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRENTANO, L., MORES, N., WENTZ, I., et al. A. *Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil*. Avian Dis. 35:793–800, 1991.

- 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. 37:615–619, 1999.
- 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. 81:2067–2075, 2000.
- KULKARNI, G., FADLY, A. *Serological evidence of chicken anemia virus infection in specific pathogen-free chickens.* Avian Dis. Oncol. Lab., 2003.
- NOTEBORN, M. H. M., KOCH, G. *Chicken anemia infection: Molecular basis of pathogenicity.* Avian Pathol. 24:11-31, 1995.
- NOTEBORN, M. H. M., TODD, D., VERSCHUEREN, C. A. J., et al. *A single chicken anaemia virus protein induces apoptosis.* J Virol, 68(1):346–51, 1994.
- PETERS, M. A., JACKSON, D. C., CRABB, B. S., et al. *Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase.* J Biol Chem, 277:39566–73, 2002.
- PRINGLE, C. R. *Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia.* Arch. Virol. 144:2065-2070, 1999.
- SCHAT K.A. *Infectious anemia.* In: Saif Y.M., Barnes H.J, Fadly A.M., Clisson J.R., McDougald L.R. & Swayne D.E. *Diseases of Poultry.* Ames Iowa State University 2003. 11. ed., p.182-202.
- TODD, D. *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review.* Avian Pathol. 29:373–394, 2000.
- TODD, D., CREELAN, J. L., MACKIE, D. P., et al. *Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent.* J Gen Virol, 71:819–23, 1990.
- YUASA N., TANIGUCHI T., YOSHIDA I. *Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks.* Avian Dis. 23:366-385, 1979.

CAPÍTULO VI

OCORRÊNCIA DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS NA AVICULTURA DE SUBSISTÊNCIA DA REGIÃO METROPOLITANA DE BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS.

*[Occurrence of chicken anemia virus in free-range chickens of the metropolitan region of
Belo Horizonte, Minas Gerais]*

RESUMO

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (*chicken anemia virus* – CAV) está descrito em galinhas da avicultura industrial brasileira desde 1991. Entretanto, estudos não foram conduzidos em avicultura de subsistência, aves que poderiam ter importância estratégica em uma eventual condição de reservatório. Com o objetivo de avaliar preliminarmente a ocorrência do CAV em galinhas de subsistência, como parte de um estudo amplo no Estado, aves da região metropolitana de Belo Horizonte – MG, foram pesquisadas. Uma *nested*-PCR para a pesquisa de região do genoma de CAV descrito previamente foi empregado. Vinte (20) amostras de timo e baço de aves submetidas à rotina de diagnóstico no Setor de Doenças das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais foram avaliadas. Em 6/20 (33%) das aves foi detectado o genoma de CAV. A presença de CAV e seu caráter imunodepressor podem representar um transtorno adicional à saúde das aves. A confirmação de CAV na avicultura de subsistência alerta para o trânsito do CAV entre os diferentes sistemas de produção. A infecção por CAV pode ter chegado à avicultura de subsistência a partir de galinhas e frangos industriais em trânsito/transporte para centrais de processamento ou descarte, por convívio ou proximidade com aves industriais, por vacinas contaminadas com CAV e por vacinação contra a anemia infecciosa das galinhas nas aves industriais, entre outros, embora a infecção possa também ter ocorrido de forma independente e por estirpes distintas e exclusivas dessa avicultura.

SUMMARY

The chicken infectious anemia virus is described in the brazilian poultry industry since 1991. However, despite the potential importance of the subsistence chickens, studies were not conducted in the free-range chickens. In order to initiate a broader study on free-range chickens, a preliminary investigation was

conducted in chickens of the metropolitan region of Belo Horizonte. A previously described nested-PCR protocol was employed. Six out of twenty (6/20, 33%) chickens (spleen and thymus) were positive for CAV. The presence of CAV in free-range chickens may be of importance in regards to the epidemiology of chicken infectious anemia. However, the origin of free-range chicken CAV is uncertain. The industrial chickens have received live vaccines contaminated with CAV during the decades of 1980 and mid-1990, and more recently a few flocks were vaccinated with the attenuated CAV vaccine. The possibility exists that the infection was originated from the industrial chickens, although it might have occurred independently with exclusive strains.

INTRODUÇÃO

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (*chicken anemia virus* – CAV) foi isolado pela primeira vez no Japão em 1979 (YUASA *et al.*, 1979). Desde então, sua presença tem sido descrita em criações comerciais em quase todo o mundo (SCHAT, 2003). Pertence à família *Circoviridae*, sendo o único representante do gênero *Gyrovirus* (PRINGLE, 1999). Os vírus dessa família são muito resistentes, tendo permanecido viáveis mesmo quando tratados a 70°C por 15 minutos e pH 3,0 (ALLAN *et al.*, 1994). São muito resistentes no ambiente, o que interfere diretamente na epidemiologia e no controle das doenças causadas por eles (TODD, 2000).

O CAV é um vírus não envelopado com genoma de DNA fita simples circular de aproximadamente 2,3 Kb (TODD *et al.*, 1990). Seu genoma codifica para três proteínas distintas, a VP1 com 51,6 kDa é a proteína estrutural do capsídeo viral (NOTEBORN e KOCH, 1995). A VP2 com 24 kDa é uma fosfatase (PETERS *et al.*, 2002) e a VP3 com 13,6 kDa, também chamada de apoptina, é uma

forte indutora de apoptose em timócitos e células linfoblásticas de galinhas (NOTEBORN *et al.*, 1994).

Um estudo de prevalência realizado por BRENTANO *et al.* (2000), indicou que 92% das matrizes pesadas testadas apresentaram anticorpos anti-CAV, demonstrando a alta prevalência desse vírus na avicultura industrial brasileira. CANAL *et al.* (2004), verificaram que 100% dos lotes de matrizes analisados tiveram pelo menos uma ave soro positiva, reforçando a alta prevalência e distribuição do vírus no Brasil. Em Minas Gerais, GOMES *et al.* (2005) demonstraram que 97,2% das matrizes de uma linhagem pesada da avicultura industrial apresentaram sorologia positiva para CAV (ELISA) a partir da 17ª semana de idade.

No Brasil não se conhece a situação sanitária da avicultura de subsistência para CAV, entretanto, em outros países, estudos foram conduzidos. Na Nigéria, o genoma de CAV foi detectado no soro de 9 em 12 galinhas de fundo de quintal, com diferenças na sequência nucleotídica do produto de PCR em comparação com CAV de aves industriais (OLUWAYELU e TODD, 2008). No Equador, anticorpos específicos para

o CAV foram detectados (n=100) com 90% de soropositividade (HERNANDES-DIVERS *et al.*, 2006).

O CAV dissemina-se tanto horizontalmente como verticalmente. A transmissão horizontal acontece via rota fecal-oral, embora a infecção via trato respiratório tenha sido demonstrada em aves infectadas experimentalmente (ROSENBERGER e CLOUD, 1989).

No campo, a doença aguda ocorre principalmente em aves jovens de 10 a 14 dias de idade infectadas verticalmente (YUASA *et al.*, 1987). Aves mais velhas (puberdade e adultas) são susceptíveis à replicação viral, mas não desenvolvem sinais clínicos (VON BULOW, 1991). A doença é caracterizada por aumento da mortalidade, redução do ganho de peso, anemia, aplasia da medula óssea, redução do hematócrito e atrofia do timo (ROSENBERGER e CLOUD, 1998). O quadro de imunodepressão apresentado pelas aves pode predispor às lesões de pele com contaminação bacteriana secundária e dermatite gangrenosa, além de interferir negativamente na resposta vacinal contra diferentes agentes (TODD, 2004).

No Brasil a avicultura de subsistência apresenta importante papel sócio-econômico, principalmente para as camadas menos favorecidas da população. É conhecido que esse tipo de criação é formado por pequenos produtores que não utilizam medidas de biossegurança em suas criações, misturando animais de diferentes origens e diferentes idades em um mesmo ambiente. A avicultura de subsistência na região pesquisada caracteriza-se

em sua maior parte por criação urbanizada e restrita, comércio não regulamentado, alimentação não balanceada, não vacinação, variadas linhagens caipiras híbridas e puras e ocorrência de diversas infecções e doenças (micoplasmoses, coriza infecciosa, doença de Marek, colibaciloses, leucose linfóide, boubá aviária e coccidioses).

A presença de CAV originário da avicultura industrial na avicultura de subsistência poderia indicar a existência de algum papel das aves de subsistência na epidemiologia da anemia infecciosa das galinhas e ressaltar a necessidade de se investigar as formas de transmissão entre estas atividades. De outra forma, a caracterização de estirpes de CAV como típicas da avicultura de subsistência, poderia indicar a circulação natural e independente das infecções por CAV nesta avicultura. Na eventualidade de as estirpes serem caracterizadas como originárias da avicultura industrial, essas aves poderiam exercer um papel de sentinelas da circulação de CAV originário da avicultura tecnificada, tanto para estirpes selvagens como vacinais. Ao revelar-se preliminarmente o status da avicultura de subsistência quanto à infecção por CAV, as informações poderiam ser disponibilizadas para a implantação de estudos e projetos de vigilância mais amplos. No presente trabalho, tentou-se traçar um paralelo entre a presença do CAV nos dois tipos de produção.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Para essa pesquisa foram avaliadas amostras de tecidos de galinhas de subsistência de 20 origens diferentes, de diversos pontos da região metropolitana de Belo Horizonte – MG, encaminhadas ao Setor de Doenças das Aves da Universidade Federal de Minas Gerais para diagnóstico. As aves foram necropsiadas e o timo e baço coletados em tubos de 1,5ml e mantidos a -20°C para posterior processamento. Como controle positivo foi utilizada a vacina comercial AviPro Thymovac® da empresa *Lohman Animal Health*.

Extração de DNA total

A extração foi realizada pelo método descrito por BOOM *et al.* (1999), através da reação do material bruto com iodeto de sódio (NaI) e adesão do ácido nucléico extraído em partículas de sílica (dióxido de silício – Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). O DNA aderido à sílica foi eluído por adição de 50µl de TE (5 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 mM EDTA pH 8,0) e estocado em freezer a -20°C. As amostras de DNA total extraídas foram analisadas e quantificadas por leitura (260-280nm) em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000.

Nested- PCR

O DNA total das amostras foi empregado como molde para a amplificação de parte do genoma de CAV pela *nested* – PCR. Foram utilizados oligonucleotídeos descritos previamente por CARDONA *et al.* (2000), 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'. Na primeira reação de amplificação, com volume final de 50µl foram utilizados: 200ng de DNA, 5µl de tampão 10X (200mM Tris-HCl pH8,4, 500mM KCl – Invitrogen), 1µl de dNTP a 10mM (dATP, dTTP, dCTP e dGTP - Invitrogen), 1,5µl de MgCl₂ a 50 mM (Invitrogen), 1µl de cada iniciador externo a 10µmol, 0,2µl de Taq Polimerase a 5U/µl (Platinum® Taq DNA Polymerase – Invitrogen) e água ultra pura q.s.p. As condições de amplificação foram de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

A reação de *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 10µmol. 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*). Foi utilizado também um controle negativo contendo todos os reagentes sem a inclusão de uma amostra de DNA. A visualização dos resultados das amplificações

(produto de 388pb na primeira reação e 211pb na segunda reação) foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH8,3, 25mM EDTA e 50mM ácido bórico) corado com brometo de etídeo e visualizado com o auxílio de um transiluminador UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 20 amostras testadas por *nested* – PCR, seis apresentaram o padrão eletroforético esperado, tanto na primeira reação quanto na segunda. Todas as aves positivas apresentavam queda no desempenho e outros problemas sanitários.

Os dados apresentados à Tab. 1 demonstram que, todas as aves positivas por *nested* – PCR para CAV apresentaram estado de doença, com etiologias variadas associadas, porém, as amostras negativas para CAV, também apresentaram problemas sanitários. Esta informação pode significar que, embora CAV possa ter papel na imunodepressão das aves examinadas, a diferença não está expressa quanto à higidez, tendo em vista a ampla variedade de desafios que as aves de subsistência são submetidas.

Em ambientes de avicultura de subsistência não são usualmente praticáveis procedimentos de desinfecção e de estratégias de biossegurança. Essa realidade, associada à condição de múltiplas origens e idades de galinhas e outras espécies de aves dividindo o mesmo ambiente, facilitam a manutenção de grande diversidade de patógenos primários e oportunistas no local.

Tabela 1. Pesquisa de CAV por *nested* – PCR em galinhas da avicultura de subsistência na região metropolitana de Belo Horizonte.

Aves	Resultado	Descrição clínica e patológica
BH16	Positivo	Ave com caquexia
BH114	Positivo	Coccidiose; gastrite por <i>Macrorhabdus ornithogaster</i> e infecção por <i>Heterakis gallinarum</i> .
BH07.....	Positivo	Doença Crônica Respiratória (DCR)
BH116	Positivo	Caquexia; ectoparasitismo por malófagos; e endoparasitismo por <i>Capillaria</i> spp. e <i>Raillietina</i> spp. e petéquias no timo e bolsa cloacal.
BH117	Positivo	Dificuldade locomotora; coccidiose e gastrite por <i>Macrorhabdus ornithogaster</i> .
BH248	Positivo	Intensa infecção por <i>Capillaria</i> spp. e <i>Raillietina</i> spp., com focos de necrose hepática e intestinos distendidos.
BH24	Negativo	Histomoníase
BH33	Negativo	Histomoníase; DCR
BH54. .	Negativo	DCR
BH107	Negativo	Ave com caquexia
BH55	Negativo	Suspeita de Newcastle
BH38	Negativo	Ave com alto parasitismo por endo e ectoparasitos e DCR.
BH109	Negativo	DCR
BH27	Negativo	Gastrite por <i>Macrorhabdus ornithogaster</i>
BH35	Negativo	DCR
BH242	Negativo	Ave com botulismo.
BH26	Negativo	Ave com alto parasitismo por endoparasitas e gastrite por <i>Macrorhabdus ornithogaster</i>
BH246	Negativo	DCR
BH09	Negativo	Ave com alto parasitismo por endo e ectoparasitos.
BH20	Negativo	Ave com alto parasitismo por endo e ectoparasitos e reagente em sorologia para <i>Mycoplasma gallisepticum</i> .

A rusticidade das galinhas de subsistência pode resultar do processo de seleção natural, em que as forças seletivas são os desafios infecciosos, parasitários e nutricionais, onde sobrevivem e reproduzem as aves resistentes a esses desafios, em contraste à seleção direcionada para a produção na avicultura industrial, com perdas em resistência (rusticidade). Com este raciocínio poder-se-ia considerar que galinhas industriais sofrem, possivelmente, maior impacto da infecção por CAV. Assim, embora o CAV presente nas aves do estudo poderia contribuir para parte do comprometimento sanitário, estas poderiam, por sua maior rusticidade, abrigar infecções subclínicas importantes.

A origem do CAV presente na avicultura de subsistência é outra pergunta importante, em que a resposta será esclarecedora para o entendimento da epidemiologia do CAV na região. Uma das hipóteses seria a transmissão do CAV da avicultura industrial para a de subsistência, favorecida especialmente em regiões de maior densidade avícola. Considera-se importante a potencial origem vacinal do CAV, pelo uso de vacinas vivas contaminadas, especialmente contra a doença de Marek, Newcastle, doença de Gumboro e Bronquite infecciosa, as mais utilizadas na avicultura industrial, conforme demonstrado em estudos retrospectivos em nosso laboratório de vacinas produzidas na década de 90 (BARRIOS *et al.* submetido para publicação 2009). Assim, a hipótese da origem vacinal indica maior probabilidade para a avicultura industrial como

fonte, uma vez que as aves de subsistência normalmente não são vacinadas.

Outra possibilidade de origem seria a própria vacina contra a anemia infecciosa das galinhas, com estirpe de CAV vivo atenuado, utilizado em alguns criatórios de matrizes industriais. Neste caso, estaria sob risco a avicultura de subsistência em sua periferia.

Todas as aves testadas são originárias da região metropolitana de Belo Horizonte, onde a avicultura industrial é menos expressiva. Porém, falhas de biossegurança podem permitir o escape de agentes patogênicos, bem como sua entrada nos sistemas de produção, eventos que podem ser favorecidos pelas características do CAV ser um vírus não envelopado extremamente resistente no ambiente. O CAV apresenta elevada resistência à grande maioria dos tratamentos normalmente empregados na limpeza e desinfecção, inclusive fumigação com formol, permitindo que o vírus persista por longos períodos nas instalações (SCHAT, 2003) e seja facilmente veiculado por fômites contaminados. O CAV pode provocar infecção persistente e ter sua eliminação intermitente em indivíduos infectados (TODD, 2004). Isso associado a um sistema de manejo sem limpeza, desinfecção e vazios sanitários, mantém a contaminação ambiental.

A criação de aves de diferentes idades no mesmo ambiente aumenta o risco de infecção, já que permite a transmissão e circulação de CAV entre lotes e o aquecimento do vírus, pois sempre são introduzidos animais susceptíveis à infecção. Ciclos repetidos de replicação viral, podem acarretar mutações pontuais no genoma

do agente, favorecendo o surgimento de estirpes de diferentes patogenidades.

O trânsito entre avicultura industrial e de subsistência existe, principalmente para as pintainhas e galinhas de postura, com potencial compartilhamento de problemas sanitários. As duas possíveis origens da infecção nas galinhas de subsistência são (1) CAV originário da avicultura de subsistência e (2) CAV originário da avicultura industrial. Não se conhece a condição sanitária da avicultura de subsistência para CAV no Brasil. Porém estudos em outros países sugerem que CAV está presente na avicultura de subsistência (OLUWAYELU e TODD, 2008, HERNANDES-DIVERS *et al.*, 2006).

A presença do CAV na avicultura de subsistência da região metropolitana de Belo Horizonte pode estar relacionada aos seguintes aspectos: não há virtualmente região livre de trânsito de aves e produtos da avicultura industrial, em algumas regiões, incluindo a grande Belo Horizonte, houve o uso de vacinas vivas contra CAV e, em toda a avicultura industrial houve o uso de vacinas vivas contaminadas com CAV até meados da década de 90 (BARRIOS *et al.* submetido para publicação 2009).

Assim, no caso do presente estudo o problema pode ter partido da avicultura industrial uma vez que a vacina de CAV é utilizada em aves de postura (matrizes leves e pesadas) com o objetivo de coibir a transmissão vertical do agente. Essas vacinas não são utilizadas na avicultura de subsistência.

Assim pensamos que pelas características citadas de CAV podemos utiliza-lo como um modelo de trânsito de infecção entre diferentes sistemas de produção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLAN, G. M., PHENIX, K. V., TODD, D., et al. *Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus*. J. Vet. Med., 41:17-26, 1994.

BARRIOS, P. R., GÓMEZ, S. Y. M., RESENDE, M., RIOS, et al. *Presença do vírus da anemia das galinhas em vacinas avícolas comerciais vivas no Brasil*. 2009.

BOOM, R., SOL, C., BELD, M., WEEL, J., et al. *Improved silica – guanidiniumthiocyanate DNA isolation procedure based on selective binding of bovine alpha – casein to silica particles*. J. Clin. Microbiol. 37:615-619, 1999.

BRENTANO L., SILVA B. G., SAYD S., et al. *Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte do Brasil*. Revta Bras. Ciênc. Avícola 2:157-179, 2000.

CANAL, C. W., FERREIRA, D. J., MACAGNAN, M., et al. *Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in southern Brazil*. Pesq. Vet. Bras. 24:89-92, 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. 81:2067-2075, 2000.

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*. XVI Encontro Nacional de Virologia, Campos do Jordão, São Paulo, 2005.

- HERNANDEZ-DIVERS, S.M., VILLEGAS, P. PRIETO, F., et al. *A survey of selected avian pathogens of backyard poultry in northwestern Ecuador*. J. Avian Med. and Surg., 2006.
- NOTEBORN, M. H. M., KOCH, G. *Chicken anemia infection: Molecular basis of pathogenicity*. Avian Pathol. 24:11-31, 1995.
- NOTEBORN, M. H. M., TODD, D., VERSCHUEREN, C. A. J., et al. *A single chicken anaemia virus protein induces apoptosis*. J Virol, 68:346–51, 1994.
- OLUWAYELU, D. O.; TODD, D. *Rapid identification of chicken anemia virus in Nigerian backyard chickens by polymerase chain reaction combined with restriction endonuclease analysis*. African J. Biotechnol. 7:271-275, 2008.
- PETERS, M. A., JACKSON, D. C., CRABB, B. S., et al.. *Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase*. J Biol Chem, 277:39566–73, 2002.
- PRINGLE, C. R. *Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydney, Australia*. Arch. Virol. 144:2065-2070, 1999.
- ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. *Chicken anemia virus*. Poult Sci, 77:1190–2, 1998.
- ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. *The effects of age, route of exposure, and coinfection with infectious bursal disease virus on the pathogenicity and transmissibility of chicken anemia agent (CAA)*. Avian Dis, 33:753–9, 1989.
- SCHAT K.A. *Infectious anemia*. In: Saif Y.M., Barnes H.J, Fadly A.M., Clisson J.R., McDougald L.R. & Swayne D.E. Diseases of Poultry. Ames Iowa State University 2003. 11. ed., p.182-202.
- TODD, D. *Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS*. Vet. Microbiol. 98:169–174, 2004.
- TODD, D. *Circoviruses: immunosuppressive threats to avian species: a review*. Avian Pathol. 29:373–394, 2000.
- TODD, D., CREELAN, J. L., MACKIE, D. P., et al. *Purification and biochemical characterization of chicken anemia agent*. J Gen Virol, 71:819–23, 1990.
- VON BULOW, V. *Avian infectious anaemia and related syndromes caused by chicken anaemia virus*. Crit Rev Poultry Biol, 3:1–17, 1991.
- YUASA, N., IMAI, K., WATANABE, K., et al. *Aetiological examination of an outbreak of haemorrhagic syndrome in a broiler flock in Japan*. Avian Pathol, 16:521–526, 1987.
- YUASA N., TANIGUCHI T., YOSHIDA I. *Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks*. Avian Dis. 23:366-385, 1979.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A anemia infecciosa das galinhas é uma das principais doenças imunodepressoras nas galinhas industriais, estando associada a situações estressantes e presença de outros problemas sanitários, com grandes prejuízos para o setor.

Pesquisas demonstram que o agente está presente e disseminado na avicultura industrial brasileira. Vários podem ser os motivos para essa realidade, um deles levantado e comprovado no presente trabalho foi a disseminação através do uso de imunobiológicos contaminados.

Esse resultado alerta para a importância da qualidade dos imunobiológicos administrados na avicultura, neste caso a pureza das vacinas vivas, e a necessidade de vigilância constante e comprometimento por parte dos órgãos reguladores para garantir a liberação de produtos seguros.

Outra explicação para a alta prevalência de CAV poderia ser a adoção de práticas que

muitas vezes não contemplam medidas de biossegurança.

A pesquisa e presença de CAV em aves de subsistência demonstra que o trânsito entre os dois sistemas de produção está acontecendo.

Já a detecção de CAV em uma ave da fauna abre novos horizontes na pesquisa da patogenia do agente em outras espécies que não galinhas e seu papel na epidemiologia da doença. Esse é o primeiro relato de CAV em uma ave da fauna.

A caracterização molecular realizada nas estirpes do estudo não permitiu estabelecer diferenças e nem relações geográficas entre as mesmas e as diferentes sequências depositadas em bancos genômicos. No entanto, acredita-se que estudos filogenéticos de outras regiões do genoma dessas mesmas estirpes podem revelar diferenças significativas, que podem ajudar a esclarecer aspectos epidemiológicos que envolvem a ave e sua exploração.

Aos meus queridos pais com amor incondicional dedico este trabalho.