**TATIANE DE FÁTIMA BRANDÃO OLIVEIRA**

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CIRCOVIRUS EM MARRECOS DE PEQUIM (*Anas platyrhynchos)* NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade do Estado de Santa Catarina–UDESC, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa

**LAGES**
**2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

de Fátima Brandão Oliveira, Tatiane
Identificação Molecular de Circovírus em Marrecos de Pequim (Anas platyrhynchos) no estado de Santa Catarina / Tatiane de Fátima Brandão Oliveira. - Lages , 2017.
76 p.

Orientador: Carlos André da Veiga Lima Rosa
Co-orientadora: Marlise Pompeo Claus
Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2017.

1. circovírus. 2. marrecos. 3. DuCV. 4. CAV. 5. qPCR. I. da Veiga Lima Rosa, Carlos André. II. Pompeo Claus, Marlise. , .III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

**TATIANE DE FÁTIMA BRANDÃO OLIVEIRA**

# IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CIRCOVIRUS EM MARRECOS DE PEQUIM (*Anas platyrhynchos*) NO ESTADO DE SANTA CATARINA

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência Animal como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

**Banca Examinadora:**

**Orientador:** _____

Dr. Carlos André da Veiga Lima Rosa

Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC/CAV

**Co-Orientador:** _____

Dra. Marlise Pompeu Claus

Instituto Federal Catarinense (IFC) – Campus Araquari-SC

**Membros:**

_____

Dr. Luiz Cláudio Miletti

Universidade do Estado de Santa Catarina

UDESC-CAV

_____

Dra. Fabiana Moreira

Instituto Federal Catarinense - IFC

Campus Araquari-SC

_____

Dr. Juahil Oliveira

Instituto Federal Catarinense – IFC

Campus Araquari-SC

_____

Dra. Fernanda Flores

Faculdade Murialdo – FAMUR

Campus Caxias do Sul - RS

**Lages, 27 de outubro de 2016.**

*Aos meus familiares, namorado, animais de estimação e amigos...*

*A vocês sempre presentes em minha vida!*

*Dedico essa conquista.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, em primeiro lugar, por ter me concedido forças para conquistar mais esse sonho! Ao meu orientador prof. *Dr. Carlos André*, pela confiança depositada em mim e aos ensinamentos e paciência durante esses anos... Obrigada professor!!! A *UDESC* pela oportunidade de ir mais além! Aos meus *familiares* que sempre me apoiaram e me incentivaram nos estudos. Ao meu marido *Murilo Selau Koppe* por ter entrado em minha vida num momento tão complicado e entendido as consequências de um doutorado! Sempre com muita calma e paciência (aliás ele é meu lado paciente!!!) Obrigada amor....

Aos grandes doutores que incentivaram e acreditaram nesse projeto, fazendo o possível e impossível para que ele acontecesse: *Dr. Samuel Cibulski, Dra. Taís Fumaco Teixeira e Dr. Helton dos* Santos... a ajuda e apoio de vocês foi imprescindível! Gostaria de agradecer imensamente minha amiga-irmã *Adriana Brasil,*. que mesmo distante sempre esteve presente! Não tenho como te agradecer! *Daíse* amiga querida...obrigada por tudooooo...sempre me apoiando em Porto Alegre...você foi essencial! *Aline Schneider* obrigada por sempre me ajudar quando não pude estar em Lages... você é uma pessoa especial!!! Eu teria inúmeros amigos para enumerar! A todos que fazem parte da minha vida e que de alguma forma contribuíram para a realização dessa conquista: o meu muito obrigada!

E não poderia deixar de agradecer aos meus animais de estimação...sempre fiéis...presentes em todos os momentos! Aos que permanecem comigo *Tufão, Mila, Biscoito, Piangers, Léia, Kirolindo e Preta Gil* e aqueles que se foram no decorrer desse ano, *Tico e Anita Garibaldi*....a alegria que vocês me proporcionaram todos os anos que estiveram comigo me ajudou a superar a perda enquanto eu escrevia essa tese! Não foi fácil...vocês serão pra sempre meus fiéis companheiros! Amo vocês pra sempre e obrigada por terem me escolhido como mãe!

*“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”*
*(Simone de Beauvoir)*

# RESUMO

A presente tese versa sobre estudos realizados visando à identificação de circovírus em marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) no estado de Santa Catarina, abrangendo as cidades de Araquari, Brusque e Jaraguá do Sul. A primeira etapa experimental consistiu na pesquisa do vírus da anemia infeciosa das galinhas (CAV) e do gyrovírus aviário tipo 2 (AGV2), através da técnica de qPCR, em amostras de baço, fígado e bursa de Fabricius de 24 marrecos de Pequim com 8 semanas em abatedouro, com histórico de alta mortalidade e redução de ganho de peso. Não foram identificados os genomas de CAV e AGV2 nas amostras de tecidos de marrecos de Pequim. A segunda etapa experimental, também pela técnica da qPCR, pesquisou a presença de circovírus dos patos (DuCV) em marrecos de Pequim. Foi desenvolvida uma qPCR para detectar e quantificar o genoma de DuCV em amostras de tecidos de baço, bursa de Fabricius e fígado de 97 marrecos de Pequim, totalizando 291 amostras. A técnica permitiu a detecção do genoma de DuCV nas amostras de tecidos de 89% das aves e 86% das amostras coletadas. O vírus foi mais prevalente em aviários e abatedouros, em aves de 2 semanas e 8 semanas respectivamente, quando comparados ao matrizeiro, o que permitiu sugerir que as práticas de biosseguridade notavelmente praticadas nas matrizes, influenciaram na quantificação do genoma de DuCV. Através da análise filogenética do vírus, verificou-se que o genótipo das amostras sequenciadas foram do tipo 1. Esse é o primeiro estudo a detectar e quantificar o genoma de DuCV em marrecos de Pequim no Brasil, e serve de alerta para melhorias sanitárias e adoção de práticas de biosseguridade nas criações de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina.



**Palavras-chave:** marrecos de Pequim, qPCR, circovírus, DuCV, CAV, AGV2.

**ABSTRACT**

This search deals with studies aimed at identifying circovirus in Pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) in Santa Catarina, Brazil, covering the cities of Araquari, Brusque and Jaragua do Sul. The virus search infectious anemia chickens (CAV) and avian type 2 gyrovírus (AGV2) was performed by qPCR technique in spleen samples, liver and bursa of Fabricius of 24 drakes slaughterhouse Pekin ducks with 8 weeks of age with high mortality historical and reducing weight gain. Have been identified the genomes of CAV and AGV2 in Peking ducks tissue samples. Also for the qPCR technique was performed circovirus search of ducks (DuCV) in ducks Pekin. One qPCR was developed to detect and quantify the genome of DuCV in spleen tissue samples, bursa of Fabricius and liver drakes 97 ducks Pekin, totaling 291 samples. The technique allowed the detection of the genome of DuCV in tissue samples from 89% of poultry and 86% of the samples. The virus was more prevalent and slaughtering poultry, birds in 2 weeks and 8 weeks, respectively, compared to the mother nursery allowing suggest that biosecurity practices notably practiced in arrays, they influenced the quantitation DuCV genome. Through phylogenetic analysis of the virus, it was found that the genotype of the sequenced samples were type 1. This is the first study to detect and quantify the genome of DuCV in Peking ducks in Brazil, and serves to alert health improvement and adoption of biosecurity practices in teals creations of Santa Catarina.

**Keywords:** Pekin ducks, qPCR, circovirus, DuCV, CAV, AGV2.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO 1

**Figura 1 -** Classificação dos membros da Família *Circoviridae*.....27
**Figura 2 -** Comparação da estrutura genômica dos Circovírus e Gyrovírus .....27
**Figura 3 -** Comparação da estrutura genômica linear de girovírus aviário tipo (AGV2) e vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) .....28

### CAPÍTULO 2

**Figura 1 -** *Screening* das amostras de baço, bursa de Fabricius e fígado para CAV e AGV2 pela técnica de qPCR.....49
**Figura 2 -** Eletroforese em gel de agarose 2% das amostras amplificadas de CAV e AGV2 por PCR.....50

### CAPÍTULO 3

**Figura 1 -** Padronização de qPCR para detecção de genoma de circovírus dos patos (DuCV): Curva Padrão construída com base na quantidade de cópias de DNA de DuCV x Ct obtido na reação de qPCR. Diluições seriadas na base 10 ($10^1$ a $10^9$) de plasmídio contendo o segmento clonado de DuCV foi usado como modelo para construção da curva.....64
**Figura 2 -** Padronização de qPCR para detecção de genoma de circovírus dos patos (DuCV): Curva de dissociação "*Curva de Melting"* de qPCR a partir de genomas de DuCV identificados em amostras de tecidos de marrecos de Pequim.....65
**Figura 3 -** Árvore filogenética mostrando a relação da amostra DuCV tipo 1 detectada no Brasil /Santa Catarina com outras amostras depositadas no GenBank.....67

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

**Tabela 1 -** Diferenças entre o pato doméstico (Cairina moschata domesticus) e o marreco de Pequim (*Anas platyrhynchos*).....25

### CAPÍTULO 2

**Tabela 1 -** Iniciadores e sondas utilizados para a detecção de CAV e AGV2 pela técnica de qPCR.....47

### CAPÍTULO 3

**Tabela 1 -** Amostras provenientes de matrizes, aviários integrados e abatedouros de Araquari, Brusque e Jaraguá do Sul, SC.....60
**Tabela 2 -** Frequência de detecção e quantificação do genoma de DuCV em marrecos de Pequim, no estado de Santa Catarina, provenientes de matrizeiros, aviários integrados e abatedouro .....66
**Tabela 3 -** Prevalência de DuCV nos três diferentes tecidos (fígado, baço e bursa de Fabricius) de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina .....66
**Tabela 4 -** Quantificação de DuCV nos diferentes tecidos de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina .....67

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| **AGV2** | Gyrovírus aviário tipo 2 |
| **BFDV** | Vírus da doença dos bicos e das penas dos psitacídeos |
| **BLAST** | *Basic Local Alignment Search Tool* |
| **CAV** | Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas |
| **CaCV** | Circovírus dos Canários |
| **CETEA** | Comitê de Ética em Experimentação Animal |
| **DuCV** | Circovírus dos patos |
| **DNA** | Ácido desoxirribonucleico |
| **dNTP** | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| **EDTA** | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| **FENARRECO** | Festa Nacional do Marreco |
| **GoCV** | Circovírus dos gansos |
| **IPVDF** | Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor |
| **kb** | Mil pares de bases |
| **kDa** | 1000 Daltons |
| **nm** | Nanomêtros |
| **nt** | Nucleotídeos |
| **ORF** | Fase aberta de leitura |
| **pb** | Pares de bases |
| **PCR** | Reação em Cadeia de Polimerase |
| **PCV1** | Circovírus suíno tipo 1 |
| **PCV2** | Circovírus suíno tipo 2 |
| **qPCR** | Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa |
| **SPF** | Livre de Patógenos Específicos |
| **UDESC** | Universidade do Estado de Santa Catarina |

**SUMÁRIO**

**CAPÍTULO 1**
**1 INTRODUÇÃO** ..... **24**
1.1 FAMÍLIA CIRCOVIRIDAE ..... **26**
1.1.1 Gênero Gyrovirus ..... **28**
1.1.1.1 Anemia Infecciosa das Galinhas ..... **30**
1.1.2 Gênero Circovírus ..... **31**
1.1.2.1 Circovírus dos Patos (DuCV) ..... **31**
1.1.2.1.1 Diagnóstico de DuCV por PCR e qPCR ..... **34**
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... **36**
**2 OBJETIVOS** ..... **42**
2.1 OBJETIVO GERAL ..... **42**
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... **42**
**CAPÍTULO 2**
**1 INTRODUÇÃO** ..... **44**
**2 MATERIAL E MÉTODOS** ..... **46**
2.1 AMOSTRAS ..... **46**
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL ..... **46**
2.3 DETECÇÃO DE CAV E AGV2 POR QPCR ..... **46**
2.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL DAS AMOSTRAS POSITIVAS ..... **47**
2.5 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR QPCR E PCR ..... **36**
**3 RESULTADOS** ..... **49**
**4 DISCUSSÃO** ..... **51**
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... **54**
**CAPÍTULO 3**
**1 INTRODUÇÃO** ..... **58**
**2 MATERIAL E MÉTODOS** ..... **59**
2.1 AMOSTRAS ..... **59**
2.2 EXTRAÇÃO DE DNA ..... **60**
2.3 PADRONIZAÇÃO DA QPCR PARA DETECÇÃO DE DUCV ..... **61**
2.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁ7LISE FILOGENÉTICA ..... **62**
2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS ..... **62**
**3 RESULTADOS** ..... **64**
3.1 ANÁLISE DO DESEMPENHO DA QPCR PARA DETECÇÃO DE DUCV ..... **64**
3.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DUCV ..... **65**
3.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA ..... **67**
**4 DISCUSSÃO** ..... **68**
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** ..... **72**
**3 CONCLUSÕES** ..... **75**
**4 CONSIDERAÇÕES FINAIS** ..... **76**

# CAPÍTULO 1

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, a avicultura emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O setor é representado por dezenas de milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras. A importância social da avicultura no Brasil se verifica, também, pela presença maciça no interior do país, principalmente nos estados do Sul e Sudeste. Em muitas cidades, a produção de frangos é a principal atividade econômica (ABPA, 2016).

Atualmente o Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango, sendo Estados Unidos e da China os maiores produtores, no entanto é o maior exportador mundial, totalizando 3.918 mil/ton de carne exportada anualmente, principalmente para países do Oriente Médio e Ásia (ABPA, 2016).

Ainda que timidamente, e considerada até bem pouco tempo como uma iguaria restrita, a produção e industrialização de marrecos e patos segue continuamente gerando novos mercados internos e externos. Marrecos são de origem asiática, norte americano e africano. Os patos domésticos descendem do pato selvagem, ocorrendo desde o México e parte da América do Sul, como também na Europa, local onde foram possivelmente introduzidos e domesticados. Com relação à taxonomia, obedecem à seguinte classificação: Classe: Aves – Ordem: Anseriformes – Família: Anatidae e suas Subfamílias; Dendrocygninae, Anatidae, Merginae e Oxyurinae, os do gênero Cairina para os patos e o gênero Anas para os marrecos. Sendo as espécies exploradas comercialmente *Anas platyrhynchos* (marrecos de Pequim; Pekin ducks) e *Cairina moschata domesticus* (patos; Muscovy) (DOMINGUES, 1968). A confusão entre patos e marrecos é comum no Brasil, porém como se pode verificar na tabela 1 são animais totalmente distintos.

O maior produtor mundial de marrecos de Pequim é a China com uma produção estimada de 400 milhões de aves/ano, enquanto na Europa os maiores produtores são a Alemanha (23 milhões), Reino Unido (10 milhões), França (4 milhões) e a Holanda (3 milhões) (KLEIN-HESSLING, 2007). No Brasil, a criação de aves exóticas cresce a cada ano, mas ainda são poucos os criatórios industriais de patos e marrecos no país. Santa Catarina é, atualmente, o maior polo industrial de produção de patos, marrecos e gansos, constituindo 75,63% da produção brasileira, seguido por Minas Gerais com 14,8% e Paraná com 6,46% (UBABEF, 2015).

Tabela 1 - Diferenças entre o pato doméstico (Cairina moschata domesticus) e o marreco de Pequim (Anas platyrhynchos).

| Caracteristica | Pato | Marreco-de-Pequim |
|---|---|---|
| Nome em inglês | Muscovy Duck | Duck ou Pekin duck |
| Habilidade para voo | Alta | Baixa |
| Comportamento de choco | Possui | Não Possui |
| Carúnculas | Vermelha, redor dos olhos e no bico | Não Possui |
| Idade aproximada de Abate | 90 dias | 50 dias |
| Tempo Incubação dos Ovos | 35 dias | 28 dias |
| Origem | América do Sul | Ásia |
| Domesticação | América do Sul e França | China e América do Norte |
| Coloração das penas | Diversas, do branco até o negro | Branca |
| Coloração da Carne | Escura | Clara |
| Dimorfismo Sexual | Tamanho do corpo e das carúnculas | Grasnado, pena enrolada no rabo (machos), tamanho do corpo e formato da cabeça |

Fonte: Adaptado de ROSSI (1997)

Em Santa Catarina, a criação de marrecos surgiu como uma alternativa de controle natural de pragas invasoras e fonte de adubação orgânica no solo nas culturas de arroz. Tradicionalmente, os produtores utilizavam produtos químicos no controle de pragas que atacavam a cultura, mas em consequência a agressão causada ao meio ambiente e a baixa produtividade da lavoura pela infestação de arroz vermelho, a criação dos marrecos de Pequim tornou-se uma excelente alternativa de controle nos arrozais (AZAMBUJA et al., 2005).

Além da criação ao ar livre para controle de arrozais, a produção de marrecos se destaca em Santa Catarina com a presença de abatedouros e criadores. É notável a tradição e o consumo da carne nas regiões do estado, enfatizado pela gastronomia e festas típicas. Na cidade de Brusque acontece a *Fenarreco* – Festa Nacional do Marreco, uma tradicional festa com apresentações folclóricas e típicos pratos preparados com a carne de marreco (PREFEITURA DE BRUSQE, 2016).

A produção dos marrecos de Pequim, embora esteja em expansão, deverá assumir características próprias e certamente a criação intensiva dessas aves, a movimentação e a concentração dos plantéis, poderão favorecer a disseminação de agentes de importância avícola.

Nesse contexto, é preocupante o fato de que muitas criações de marrecos não têm acompanhamento sanitário e a ausência de estudos nessa espécie dificulta a correta interpretação de

problemas nas criações como alta mortalidade na recria, baixo desenvolvimento corporal e desuniformidade de lotes, sem, contudo, apresentar lesões ou sintomas de doenças específicas, como alegam os criadores.

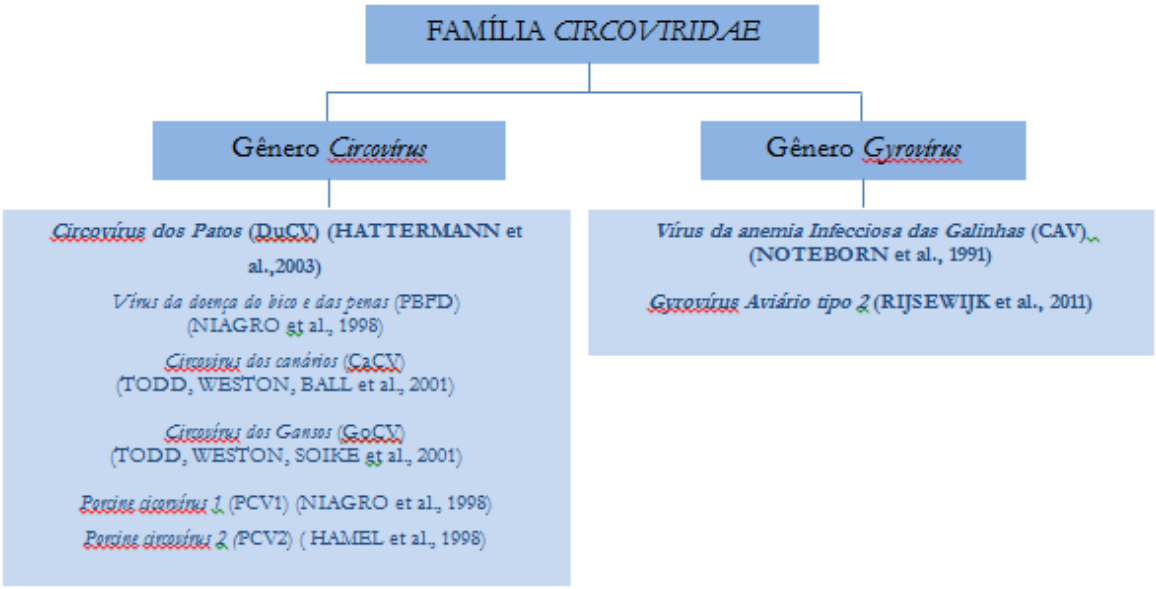
Mesmo diante da ausência de doença clínica, marrecos podem apresentar formas subclínicas, que acarretam em baixos índices de produção e redução de imunidade, oportunizando agentes secundários (BANDA et al., 2007). Esse padrão de comportamento sanitário já é bem caracterizado em galinhas comerciais, e são definidas como doenças imunossupressoras, na qual podemos citar a anemia infecciosa das galinhas, conhecida como CAV *(Chicken Anemia Virus)* e em patos domésticos, as circoviroses de patos (DuCV) ambas causadas por vírus da família *Circoviridae* (SCHAT et al., 2003; HATTERMANN et al., 2003).

## 1.1 FAMÍLIA CIRCOVIRIDAE

A família *Circoviridae* compreende o gênero ***Gyrovirus***, no qual incluem o vírus da anemia infecciosa das galinhas *(CAV- Chicken Anemia Virus*) (TODD, 2000) e o Girovírus Aviário tipo 2 (*AGV2- Avian Gyrovirus 2)* (RIJSEWIJK et al., 2011) e o gênero ***Circovírus***, que incluem dentre outros vírus, o Circovírus dos suínos tipo 2 (PCV2) e o Circovírus dos patos (DuCV) (HATTERMANN et al., 2003) (Figura 1).

Os circovírus aviários são conhecidos por afetar as funções imunitárias humorais e celulares das aves. A imunossupressão induzida pelos circovírus aumenta a patogenicidade de agentes secundários, onde o curso e o resultado da infecção dependerão das infecções simultâneas presentes e outros fatores predisponentes. As infecções subclínicas podem ocorrer, porém em aves comerciais podem causar perdas econômicas significativas, devido principalmente às alterações de desenvolvimento corporal, como a redução de ganho de peso (FLORES et al., 2007).

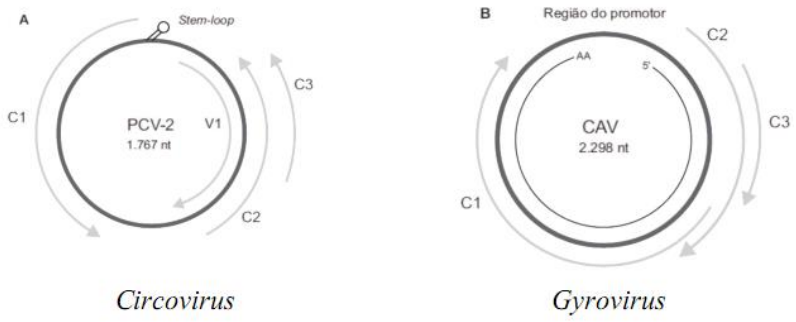
Figura 1- Classificação dos membros da Família *Circoviridae.*




Fonte: Adaptado de FLORES et al., 2007.

Os membros da família *Circoviridae* possuem vírions icosaédricos, sem envelope, com 14 a 26nm de diâmetro. O genoma DNA circular de fita simples (1.7-2.3kb) é um dos menores entre os vírus animais. Os vírus do gênero *Circovírus* possuem um genoma ambisenso, ao contrário dos vírus do gênero *Gyrovírus* que possuem genoma de polaridade negativa (NOTEBORN et al., 1991) (Figura 2).

Figura 2- Comparação da estrutura genômica dos Circovírus e Gyrovírus.




Fonte: Adaptado de Santos, 2012.

Os circovírus são os menores vírus capazes de replicação autônoma em células de mamíferos. A replicação ocorre no núcleo das células, durante a fase S do ciclo celular e envolve a síntese de uma molécula de DNA de fita simples (replicativo intermediário) e após esse evento o genoma é replicado pelo mecanismo de círculo rolante (FLORES et al., 2007).

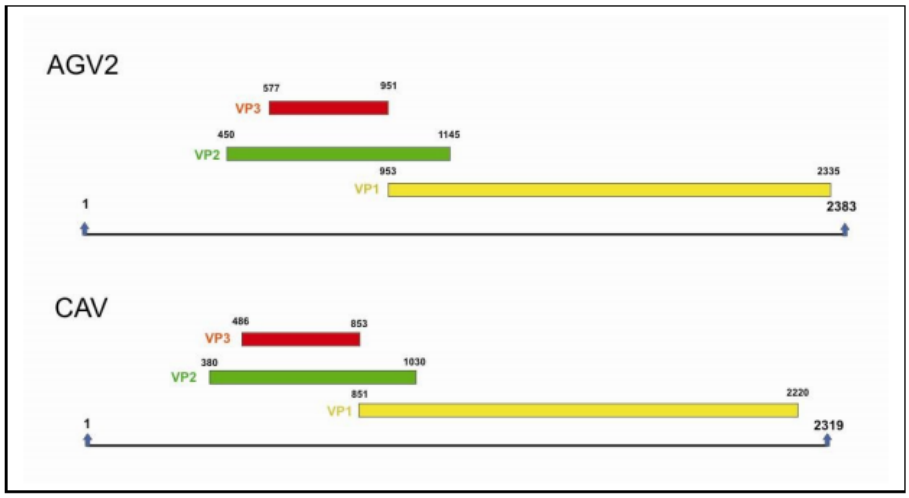
A primeira descrição dos vírus de genoma circular de fita simples foi o *Porcine Circovirus* (PCV), contaminando células renais de suínos (TISCHER et al., 1982). Mais tarde, o vírus da doença do bico e das penas (BFDV) e *Chicken Anaemia Virus* (CAV) foram também caracterizados como vírus icosaédricos contendo pequeno genoma circular de fita simples (GELDERBLOM et al., 1989; RITCHIE et al., 1989). Com o passar dos anos outros vírus foram classificados homólogos e incluídos na família *Circoviridae*. Desde 1997, tem sido descritos circovírus associados à espécie aviária.

### 1.1.1 Gênero Gyrovirus

O gênero *Gyrovirus* inclui o vírus da anemia infecciosa das galinhas *(CAV- Chicken Anemia Virus*) (TODD, 2000) e o Gyrovírus Aviário tipo 2 (*AGV2- Avian Gyrovirus 2)* (RIJSEWIJK et al., 2011).

O genoma do CAV constitui-se de uma molécula de DNA de fita dupla com 2298 a 2319 nucleotídeos. O genoma do AGV2 contém aproximadamente 2383 nucleotídeos. Nele encontram-se ORF´s (regiões de leitura aberta) sobrepostas entre si, cada uma codificando uma das três proteínas do CAV: VP1, VP2 e VP3.

Figura 3- Comparação da estrutura genômica linear de girovírus aviário tipo 2 (AGV2) e vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV)




Fonte: Adaptado de SANTOS, 2012.

A proteína VP1 (51,6 kDa) é codificada pela ORF1 sendo a proteína estrutural encontrada no capsídeo viral (NOTEBORN e KOCH, 1995). A VP2 (24 kDa) é uma fosfatase (PETERS et al., 2002) e participa da apoptose celular (NOTEBORN, 2004). A VP3 com 13,6 kDa, também

chamada de apoptina, é uma indutora de apoptose em timócitos e células linfoblastóides de galinhas, sendo importante na patogenia do CAV devido acarretar a imunossupressão nas aves (NOTEBORN et al., 1994).

O vírus *Chicken Anemia Virus* (CAV) foi descoberto no Japão em 1979 (YUASA et al., 1979) e vem sendo isolado em quase todo mundo e em todos os países que possuem avicultura comercial (SCHAT e VAN SANTEN, 2008; SCHAT et al., 2003; TORO et al., 1994; LUCIO et al., 1990). No Brasil, foi encontrado pela primeira vez em frangos de corte nos estados de Santa Catarina e São Paulo, apresentando baixo ganho de peso, anemia e atrofia de timo (BRETANO et al.,1991).

O CAV é bastante resistente ao tratamento químico e físico. Resiste ao calor de 70ºC por 60 minutos ou 80ºC por 15 minutos e a um pH de 3,0. O vírus é resistente a amônia quartenária, clorofórmio e ao éter etílico. Fenol 50% por 5 minutos e hipoclorito de sódio a uma concentração de 10% por 2 horas pode inativar o vírus. O uso do glutaraldeído (1%) e formol (5%) também podem inativar o vírus quando exposto a 24 horas a temperatura ambiente (YUASA et al, 1983).

Desde a descoberta do CAV, o girovírus aviário tipo 2 (AGV2) foi o primeiro membro dentro do gênero girovírus a ser descrito. O AGV2 foi isolado inicialmente em galinhas e frangos da Holanda e do sul do Brasil (SANTOS et al., 2012; RIJSEWIJK et al., 2011 ). Estudos têm demonstrado que, semelhante ao CAV, o vírus AGV2 também se encontra disseminado em plantéis avícolas, porém seu potencial patogênico e sua epidemiologia ainda permanecem desconhecidos. AGV2 foi descrito em amostras de tecidos (bursa, medula óssea e baço) de galinhas de Santa Catarina, Rio Grande do sul e Holanda (RIJSEWIJK et al., 2011). Também já foi encontrado em amostras de fezes humanas (PHAN et al., 2012; CHU et al., 2012), galinhas e outros pássaros, tanto em aves saudáveis quanto em aves doentes (SANTOS et al., 2012; LIMA et al. 2012).

Semelhante a outros *Circovírus*, o AGV2 parece ser bastante resistente na natureza. ESTEVES et al. (2012) identificaram AGV2 em aves livres de patógenos específicos (SPF) alojadas em cama de aviário tratada por fermentação. O DNA de AGV2 também pode ser carreado por insetos comumente encontrados nas criações comerciais, como *Alphitobius dioperinus* (cascudinho) (COSTA et al., 2012).

O diagnóstico mais usado atualmente para detecção de CAV e AGV2 é a PCR. Vários protocolos têm sido desenvolvidos para detectar o DNA viral em diversos materiais como tecidos, soro e bulbo de penas (SANTOS et al., 2012).

*1.1.1.1 Anemia Infecciosa das Galinhas*

O vírus CAV é causador da doença conhecida como anemia infecciosa das galinhas, caracterizada por aumento da mortalidade, redução do ganho de peso, anemia, hipotrofia da medula óssea e atrofia do timo (ROSENBERGER e CLOUD, 1998).

Aves de todas as idades são susceptíveis ao vírus, porém a doença clínica se manifesta com maior grau de severidade em aves de até três semanas de idade, no qual se desenvolvem lesões ou viremia persistente. Já as aves adultas produzem anticorpos contra o vírus, o que evita a doença clínica, mas possibilita a infecção vertical à prole, sendo a forma mais comum de transmissão do vírus (MILLER e SCHAT, 2004; TOOD, 2004; YUASA et al., 1979;).

As lesões macroscópicas incluem anemia, medula óssea pálida, timo, baço e bursa diminuídos de volume, com a severidade das lesões diretamente relacionadas à presença de outros agentes concomitantes ao CAV como o vírus da doença da Bursa, doença de Marek e reovírus (TOOD, 2004). A anemia infecciosa das galinhas acarreta um quadro de imunodepressão que reduz a imunidade das aves e consequentemente a resposta vacinal a vários outros agentes. Esse quadro pode acarretar lesões de pele nas aves com infecções secundárias e dermatites gangrenosas (TOOD, 2004).

COSTA et al. (2013) pesquisaram o CAV em penas de marrecos de Pequim do norte de Santa Catarina, não encontrando o genoma do vírus, assim também como não foi encontrado em amostras de tecido de outras espécies de aves como codornas, patos, avestruzes, pombos e aves silvestres, sugerindo que as galinhas ainda são os únicos hospedeiros para o vírus (GOMES, 2012).

Entretanto, um relato de caso mostrou a presença de CAV em amostras de baço e timo de *Forpus Xanthopterygius* - Periquito Tuim, alertando para as pesquisas desse agente em outras espécies que não galinhas (BARRIOS, 2009). FARKAS et al. (1998) sugeriram que soros de codornas Japonesas apresentaram anticorpos contra o vírus da anemia infecciosa das galinhas.

Sabe-se que o CAV está presente na maioria das criações avícolas podendo ser transmitido de forma horizontal, por via fecal-oral (JOINER et al., 2005) ou através das penas, que constitui-se umas das principais formas de transmissão e perpetuação do CAV nos lotes de aves (DAVIDSON et al., 2008). A transmissão vertical também poderá ocorrer através dos ovos de matrizes soro-negativas recentemente infectadas (CHETTLER et al., 1989).

Por ser um vírus altamente resistente no meio ambiente, o CAV pode permanecer por longos períodos nas instalações, portanto mesmo na impossibilidade de evitar a exposição ao vírus deve-se preconizar a redução dos impactos negativos da doença e as chances de transmissão vertical (SCHAT, 2003). A limpeza rigorosa dos aviários aliada as boas práticas de biossegurança pode

reduzir o impacto das infecções a campo (YUASA, 1992; YUASA et al.,1983). Assim como a adoção de medidas de biosseguridade nas instalações, o controle de outros agentes que contribuem para o agravamento do quadro de imunodepressão são práticas importantes no controle da doença (SCHAT, 2003; ROSENBERGER e CLOUD, 1998). No Brasil têm sido utilizadas as vacinas vivas atenuadas em reprodutoras, que transferem anticorpos maternais protetores à prole. O monitoramento dos níveis de anticorpos maternos é essencial para o controle da doença e eficácia vacinal (SCHAT e van SANTEN, 2008).

### 1.1.2 Gênero Circovírus

Os circovírus pertencem à família *Circoviridae* (TODD, 2000) e inclui sete circovírus: o vírus da doença dos bicos e penas dos psitacídeos (BFDV) (NIAGRO et al, 1998;. BASSAMI et al, 1998), circovírus dos pombos (PiCV) (TODD et al, 2001; MANKERTZ et al, 2000), circovírus dos canário (CaCV) (PHENIX et al., 2001), circovírus dos gansos (GoCV) (TODD et al., 2001) e o circovírus dos patos (DuCV) (SOIKE et al., 2004; HATTERMANN et al., 2003) e dois circovírus suínos, PCV1 e PCV2 (NIAGRO et al., 1998; HAMEL et al., 1998).

Dentre os vírus pertencentes ao gênero circovírus, o mais bem caracterizado na literatura é o circovírus dos suínos (PCV2), envolvido na etiologia da *síndrome da circovirose suína*, sendo a síndrome multissistêmica do definhamento (SDMS) a forma clínica mais conhecida da doença (SEGALES et al., 2002).

Os relatos de infecções circovirais em gansos, patos, faisões e pombos aumentaram a conscientização e a busca por mais informações associadas ao impacto das circoviroses no comércio avícola. Um exemplo disso são os prejuízos em granjas na China, que mesmo tecnificadas, problemas como retardo de crescimento e aumento de morbidade têm sido atribuídos ao vírus (ZHANG et al., 2009).

#### *1.1.2.1 Circovírus dos Patos (DuCV)*

O circovírus dos patos e marrecos (DuCV) foi primeiramente isolado de tecido de bursa de Fabricius em patos Mulard (híbrido de *Cairina moschata* × *Anas platyrhynchos*) de fazendas na Alemanha (HATTERMANN et al., 2003). Desde então, DuCV tem sido detectado em patos Muscovy *(Cairina moschata)*, patos Mulard, patos de vida livre (*Melanitta fusca*) e marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) em regiões da Hungria, Taiwan, Estados Unidos, China, Coreia do Sul e Polônia (MATCZUK et al., 2015; CHA et al., 2014; CHA et al., 2013; WANG et al., 2011;

ZHANG et al., 2009; BANDA et al., 2007; CHEN et al., 2006; FRINGUELLI et al., 2005). No Brasil, até o momento, não existem relatos de circovírus em marrecos de Pequim ou qualquer espécie de patos.

Assim como outros circovírus pertencentes à família *Circoviridae*, os circovírus dos patos e marrecos (DuCV) são pequenos (15 a 16nm de diâmetro), de formato icosaédrico, sem envelope e genoma circular de cadeia simples apresentando 1996 nucleotídeos (cerca de 1,99Kb) (WANG et al., 2011; HATTERMANN et al., 2003;). O genoma do DuCV está organizado numa direção ambisense e três maiores regiões de leitura aberta (ORFs) são designadas ORF1 (gene rep) que codifica uma região de 33.6kDa, proteína envolvida na replicação viral (replicase), ORF2 (gene cap) localizada em orientação oposta e codifica uma região de 29.7kDa – maior proteína de capsídeo imunogênica e pequenas ORF´s adicionais estão presentes em alguns dos circovírus (LIU et al., 2010; HATTERMANN et al., 2003; TODD et al, 2001; NIAGRO et al, 1998;). Uma ORF3 localizada na cadeia complementar de ORF1 está relacionada com atividade apoptótica (XIANG et al., 2012).

Ainda com relação ao genoma do DuCV caracteriza-se duas regiões intergênicas entre as duas ORFs (rep e cap) com uma estrutura em alça altamente conservada (*stem loop)* de nove nucleotídeos (nonâmero) ***5'-TAT TATT AC***, que por sua vez diferencia o DuCV de outros circovírus. Adjacente a alça, observa-se a presença de um hexâmetro 5´ACTCCG repetido duas vezes (BANDA et al., 2007; HATTERMANN et al., 2003).

Baseado nas análises do gene do capsídeo e da sequencia genômica, foram identificados dois genótipos DuCV: *DuCV1* e *DuCV2*. Estudos mostraram que essa divisão possui uma diferença de aproximadamente 10% entre a sequência genômica dos vírus isolados da Alemanha e Estados Unidos (linhagem Euro-EUA) com os isolados de Taiwan e China continental (linhagem Taiwan) (WAN et al., 2011). Eventos de recombinação podem estar contribuindo para a diversidade genética e consequentemente para a evolução do vírus com surgimento de novas cepas (ZHANG et al., 2013).

Circovírus aviários são associados, geralmente, à doença subclínica ou caracterizados por infecções concomitantes como consequência do comprometimento da resposta imune (BANDA et al., 2007; FRINGUELLI et al., 2005). Em animais domésticos, além da forma subclínica, os circovírus podem se manifestar como doenças severas, incluindo-se nesses casos o *porcine circovírus 2* (PCV2) afetando suínos em várias regiões do mundo (ALLAN et al., 1998). A infecção por DuCV tem sido relacionada a desordens de plumagens, baixo ganho de peso e severa

imunossupressão. O exame histopatológico da bursa de Fabricius demonstrou depleção de linfócitos, necrose e histiocitose (SOIKE et al., 2004).

Infecções por DuCV são descritas como altamente prevalentes em regiões como Hungria (84%) (FRINGUELLI et al., 2005), onde sugere-se que o vírus possa estar disseminado em fazendas de patos e marrecos. Muitas fazendas da China apresentaram positividade variando de 15,28% a 81,63% (WAN et al., 2011; JIANG et al., 2009; LIU et al., 2009; ZHANG et al., 2009), no qual observa-se alta morbidade, estando o DuCV associado a perdas econômicas significativas de até 70%. Em contraste, observa-se baixa prevalência nos Estados Unidos (6,1%) e a infecção sugere não representar um problema significativo para a indústria de patos (BANDA et al., 2007). O mesmo ocorre em descrições sobre o vírus em patos e marrecos na Alemanha (HATTERMANN et al., 2003) e Taiwan (38,2%) (CHEN et al., 2006).

Os fatores que interferem no curso e resultado da infecção são desconhecidos, porém alguns autores têm sugerido a estirpe do vírus, via de exposição, a dose de vírus, os níveis de anticorpos maternos e presença de outros patógenos como potenciais interferências na infecção (MCNULTY e TODD, 2008; WOODS e LATIMER, 2008; FRINGUELLI et al., 2005; SOIKE et al 2004).

Com relação à prevalência de infecção subclínica de DuCV, CHA et al. (2014) detectou o vírus em 21,8% (32/147) das amostras de bursa de Fabricius e fígado de marrecos de Pequim sem sinais clínicos, do sul da Coréia. Ainda nesse estudo, demonstrou que a infecção por DuCV foi mais prevalente em marrecos com mais de três semanas de idade, corroborando os resultados de outras investigações que afirmam que patos jovens entre 3 e 4 semanas são mais sensíveis a infecção de DuCV ( WAN et al., 2011; ZHANG et al., 2009).

A explicação pelo qual os danos resultantes de infecções subclínicas de DuCV acarretam prejuízos às produções tem sido pouco investigada, porém sabe-se que DuCV predispõem patos e marrecos a outras doenças e infecções concomitantes com *Riemerella antipestifer*, *Pasteurella multocida*, *Staphilococcus aureus*, vírus da hepatite dos patos (DHV) e Salmonelas (CHA et al., 2014; ZHANG et al., 2009; BANDA et al., 2007; SOIKE et al., 2004). Sinais de infecções secundárias, incluindo artrite leve e pericardite fibrinosa também foram relatadas (BANDA et al 2007). Outro dado importante sugere que a morbidade em fazendas devido a doenças bacterianas (infecções por *Riemerella antipestifer* e *Salmoneloses)*, é maior em patos com a presença de DuCV quando comparadas a patos sem o vírus (CHA et al., 2014).

As infecções por circovírus compartilham muitas características (SOIKE et al., 2004) e é patente extrapolar a partir de estudos com circovirus em outras espécies aviárias. A transmissão horizontal, através da via respiratória ou fecal-oral, é sugerida ser a via mais comum de infecção de

DuCV, porém a transmissão vertical também pode ocorrer, como acontece com o Chicken Anemia Virus (CAV) e o vírus do Bico e das Penas dos Piscitacídeos (BFDV) (MCNULTY e TODD 2008; TODD et al 2006; FAUQUET et al 2005). A alta prevalência do vírus em populações de patos livres da China (LIU et al., 2010) e um estudo relatando a detecção de DuCV1 e DuCV2 em patos recém-nascidos, patos mortos e ovos não fertilizados (LI et al., 2014) podem ser informações que embasem as evidências de transmissão do DuCV.

Ainda não está estabelecido um programa sanitário de controle para DuCV, porém autores têm alertado sobre o fato de DuCV está associado a doenças clínicas e a infecções subclínicas e que possivelmente possa comprometer economicamente as produções de patos e marrecos. Devido a isso, têm sido recomendados programas de monitoria sanitária para o controle das doenças e maiores estudos para o melhor conhecimento da patogenia e transmissão de DuCV (CHA et al., 2014).

#### 1.1.2.1.1 Diagnóstico de DuCV por PCR e qPCR

Diagnóstico histopatológico de circoviroses aviárias geralmente envolve a detecção de inclusões basofílicas no citoplasma de tecidos linfóides, como bursa de Fabricius. Embora esses achados histopatológicos sejam comuns em infecções de circovírus de pombos, gansos e piscitacídeos, não são comuns em infecções por DuCV (FRINGUELLI et al., 2005). Nesse caso, a técnica de PCR tem sido importante e vem sendo utilizada nos diagnósticos de circovirus dos patos (LI et al., 2014; CHA et al., 2013; ZHANG et al., 2012; WAN et al., 2011a ).

Embora a PCR seja importante no diagnóstico de DuCV, estudos relatam a maior sensibilidade e especificidade da qPCR em relação a PCR convencional (WAN et al., 2011; JIANG et al., 2009; HALAMI et al.,2008 FRINGUELLI et al., 2005). Infecções e co-infecções por DuCV tem sido comuns e reportadas em patos e marrecos sem nenhuma alteração clínica (WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2009). Nesse contexto, a possibilidade de quantificar a carga viral pela técnica de qPCR, faz com que ela seja uma valiosa ferramenta no entendimento dos mecanismos de infecção de DuCV.

FRINGUELLI et al. (2005) reportou o primeiro estudo utilizando a qPCR para diagnóstico de DuCV em amostras de bursa de Fabricius de patos e marrecos de Pequim em criações da Hungria. Nesse estudo, além de demonstrar maior sensibilidade e especificidade da técnica quando comparada a PCR convencional, mostrou que amostras de bursa de Fabricius apresentaram mais de $10^{13}$ cópias do genoma de DuCV/g de tecido em aves com idade superior a 5 semanas.

O circovírus dos patos tem sido detectado em baço, bursa de Fabricius e fígado de patos e marrecos sadios, doentes e mortos (CHA et al, 2013; WAN et al., 2011; ZHANG et al., 2012; WANG et al., 2011; FRINGUELLI et al., 2005; HATTERMANN et al., 2003) , sugerindo que esses sejam os tecidos de eleição para o diagnóstico de DuCV pelas técnicas de PCR e qPCR.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal**. Disponível em:< http:// www. abpa-br.com.br. Acesso em: 02/05/2015.

ALLAN, G.M. **Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe**. J Vet Diagn Investig, v.10, p.3-10, 1998.

AZAMBUJA, M.O.; PETTINE, L.J. **Controle Biológico de Pragas e Invasoras do Arroz Irrigado com o Marreco-de-Pequim**. Extensão Rural e Desenvolvimento Sustentável. Porto Alegre, v.1 n.4, 2005.

BANDA, A.; GALLOWAY-HASKINS, RI.; SANDHU, TS.; SCHAT, KA. **Genetic analysis of a duck circovirus detected in commercial pekin ducks in New York**. Avian Dis.51:90–5, 2007.

BARRIOS, P.R. **A retrospective PCR investigation of avian Orthoreovirus, chicken infectious anemia and fowl Aviadenovirus genomes contamination in commercial poultry vaccines in Brazil.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 64, p. 231-235, 2012.

BASSAMI, M.R.; BERRYMAN, D.; WILCOX, G.E. **Psittacine beak and feather disease virus nucleotide sequence analysis and its relationship to porcine circovirus, plant circoviruses, and chicken anemia virus**. Virology, v.249, p.453-459, 1998.

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

CHA, S. Y.; KANG M.; YOON R. H. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates in Pekin ducks from South Korea.** Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 36: 473- 479, 2013.

CHA S.Y.; SONG ET AL.**Prevalence of duck circovirus infection of subclinical pekin ducks in South Korea**. J Vet Med Sci. ;76:597–99, 2014.

CHEN C. L., WANG P. X., LEE M. S., SHIEN J. H., SHIEH H. K., OU S. J., CHEN C. H., CHANG P. C. **Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus**. *Avian Dis.* 50: 92–95, 2006.

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

CHU, D.K.W . **Characterization of novel gyrovirus in human stool and chicken meat.** Journal of Clinical Virology, 2012.

COSTA et al. **Diagnóstico de anemia infecciosa das galinhas em marrecos de Pequim por PCR em tempo real**. In: Jornada de Iniciação Científica- JINC, 7. Anais...Concórdia: Embrapa, p.17, 2013.

COSTA, C. **Detecção molecular de Gyrovírus aviário tipo 2 (AGV2) em aves SPF alojadas em camas comerciais e em cascudinhos presentes na cama**. IN: Seminário de Pesquisa e Extensão da UnC, 2., Jornada de Iniciação Científica Embrapa, 6, 2012.

DAVIDISON, I. **The contribuition of feathers in the spread of chicken anemia virus**. Virus Research 132:152-159, 2008.

DOMINGUES, O. **Introdução à Zootecnia**. 3 edição. Rio de Janeiro: MA/SIA. 392 pag., cap.4., p.83-151, 1968.

ESTEVES, P. A.; Trevisol, I. M.; Franco, A. C.; Cornelissen, L.; Silva, V. S.; Rech, R. R. **Molecular detection of avian gyrovirus type 2 (AGV2) in specific pathogen free (SPF) chickens housed on commercial broiler litter.** In: WORLD´S POULTRY CONGRESS, 24., 2012, Salvador. Abstract... Salvador: WSPA, 2012. 1 CD-ROM. World's Poultry Science Journal, v. 68, 2012.

FARKAS, T., TANAKA, A., KAI, K. **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.

FLORES, E.F. **Virologia Veterinária**. 2. ed. Santa Maria, RS. Ed. Da UFSM,. 888p, 2007.

FRINGUELLI E., SCOTT A., BECKETT A., MCKILLEN J., SMYTH J., PALYA V., GLAVITS R., IVANICS E., MANKERTZ A., FRANCIOSINI M. **Diagnosis of duck circovirus infections by conventional and real-time polymerase chain reaction tests.** *Avian Pathol.* 34: 495–500, 2005.

GELDERBLOM, H et al. **Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA)**. Archives of Virology, 109: 115–120. 1989.

GOMES, S. 2012. **Anemia infecciosa das galinhas em Minas Gerais: diversidade genética e epidemiologia molecular**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

HATTERMANN K, SCHMITT, C.;, SOIKE, D.; MANKERTZ, A. . **Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV)**. Arch Virol. 2003;148:2471–80, 2003.

JIANG, S., ZHANG, X. LIU, S., WANG, Y. **PCR detection and sequence analysis of duck circovirus in sick Muscovy ducks**. Virology. Sin. 23, 265-271, 2009.

JOINER, K.S., EDWALD, S.J., HOER, F.J. **Oral infection with chicken anemia virus in 4-wk broiler breeders: lack of effect of major histocompatibility B complex genotype**. Avian Dis. 49, 482-487, 2015.

KLEIN-HESSLING, H. **Peking duck breeders require special management.** World Poultry, v. 23, n.11, p.14-18, 2007.

LI, Z.; WANG, X.; ZHANG ET AL. **Evidence of possible vertical transmission of duck circovirus**. Veterinary Microbiology, 174:229-232, 2014.

LIMA, F.E.S. **Detection of avian gyrovirus type 2 in an Alagoas Curassow (Mitu mitu).** In: Brazilian Congress of Virology, 23., Mercosul Meeting of Virology, 7, 2012.

LIU, S.N., X. X. ZHANG, J. F. ZOU, Z. J. XIE, Y. L. ZHU, Q. ZHAO, E. **Developemnt of an indirect ELISA for the detection of duck circovirus infection in duck flocks.** Vet. Microbiology. 145:41-46, 2010.

LUCIO,B.;SCHAT, K.A.;SHIVAPRASAD,H.L**. Identificacion of the chicken anemia agente, reproduction of the chicken anemia agent, reproduction of the disease, and serological survey in the United States.** Avian Diseases, v.34, p.146-153, 1990.

MANKERTZ A, HATTERMANN K, EHLERS B, SOIKE D. **Cloning and sequencing of columbid circovirus (CoCV), a new circovirus from pigeons.** Arch Virol. 145: 2469-79, 2000.

MATCZUK, A.C., KRAWIEC, M. **A new duck circovirus sequence, detected in velvet scoter (*Melanitta fusca*) supports great diversity among thius species of virus**. Virology Journal, 12:121, 2015.

MCNULTY, M.S. AND TODD, D. **Chicken anemia virus. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens**. 5th ed L.D. Zavala, D.E. Swayne, J.R. Glission, J.E. Pearson, W.M. Reed, M.W. Jackwood and P.R. Woolcock. Omni Press Inc., Madison, Wisconsin. 124-127, 2008.

MILLER, M.M.; EALEY . **Detection of chicken anemia virus DNA in embryonal tissues and eggshell membranes**. Avian Disease, v.47, p.662-671, 2003.

MILLER, M.N., SCHAT, K.A. **Chicken infectious anemia vírus: Na example of the ultimate host-parasite relationship**. Avian Diseases, v.48, p.734-745, 2004.

NIAGRO, F.D. **Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminivus and plant circoviruses**. Archives of Virology, v.143, p.1723-1744, 1998.

NOTEBORN, M. H. M., KOCH, G. **Anemia infection: Molecular basis of pathogenicity.** Avian Pathol. 24:11-31, 1995.

NOTEBORN, M. H. M., TODD, D., VERSCHUEREN, C. A. J. **A single chicken anaemia virus protein induces apoptosis**. J Virol, 68:346–51, 1994.

NOTEBORN, M.H., De Boer, G.F., Van Roozelaar, D.J., Karreman, C., Kranenburg, O., Vos, J.G., Jeurissen, S.H.M., Hoeben, R.C., Zantema, A., Koch, G., Van Ormondt, H. e Van der Eb, A.J. **Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle**. Jornal of Virology, 65: 3131–3139, 1991.

NOTEBORN, M.H.M. **Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms**. Veterinary Microbiology, v. 98, p. 89-94, 2004.

NOTEBORN, M.H.M.;KOCH, G. **Chicken anemia virus infection: Molecular basis of pathogenicity.** Avian Pathology, v.24, p.11-31, 1995.

PETERS, M. A., JACKSON, D. C., CRABB, B. S. **Chicken anemia virus VP2 is a novel dual specificity protein phosphatase.** J Biol Chem, 277:39566–73, 2002.

PHAN, T.G. **A third gyrovirus species in human faeces.** Journal of General Viroloy, 93 6 1356-1361, 2012.

PREFEITURA DE BRUSQUE. **Festa Nacional do Marreco.** Disponível em http://www.brusque.sc.gov.br/web/index.php . Acesso em 03/05/2015.

RIJSEWIJK, F.A.M., et al. **Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus**. Archive Virology, v. 156, p. 1097-1100, 2011.
RITCHIE, B.W., NIAGRO, F.D., LUKERT, P.D., STEFFENS, W.L. & LATIMER, K.S. **Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease**. Virology, 171, 83-88, 1989.

ROSENBERGER, J. K., CLOUD, S. S. **Chicken anemia virus**. Poult Sci, 77:1190–2, 1998.

ROSSI, F. **Criação de Marrecos**. Viçosa: CPT. DVD, 1997.

SANTOS, H.F. **Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlan**ds. Veterinary Microbiology, v. 155, p. 230-236, 2012.

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. 11. ed., p.182-202, 2003.

SCHAT, K.A. **Chicken Infeccious Anemia.** IN: SAIF, Y.M., et al. (eds). Disease of poultry. 11rd. ed. Ames: Iowa State Press, 2003.

SEGALE'S J, ALLAN GM, DOMINGO M. **Porcine circovirus diseases**. Anim Health Res Rev. 6:119–142, 2005.

SHAT, K.A.; VAN SANTEN, V. **Chicken infectious anemia.** In: SAIF, Y.M., et al. (eds) Disease of Poultry. Ames: Blackwell Publishing, p 211-235, 2008.

SOIKE D., ALBRECHT K., HATTERMANN K., SCHMITT C., MANKERTZ A. **Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders**. Vet. Rec. 154: 792–793, 2004.

TISCHER, I.; GELDERBLOM, H.; VETTERMANN, W.; KOCH, M. A. **A very small porcine virus with a circular singlestranded DNA**. Nature, v.295, p.64-66, 1982. 291 Arq. Inst. Biol., São Paulo, v.74, n.3, p.281-29, 1982.

TODD, D. **Circoviruses: immunossupressive threats to avian species: a review**. Avian pathology: Journal of the W.V.P.A., v. 29, p. 373-394, 2000.

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

TODD, D.; WESTON, JH.; SOIKE, D.; SMYTH, JA. **Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon**. Virology;286:354–362, 2001a.
TORO, H. **Detection of chicken anemia virus antibodies in four poultry operations in Chile.** Preventive Veterinary Medicinal, v.21, p.103-106, 1994.

WAN ET AL. **The development of a rapidSYBR green I-based quantitative PCR for detection of duck circovirus.** Virology Journal. 8, 465, 2011a.

WAN ET AL., WAN C. H., FU G. H., SHI S. H., CHENG L. F., CHEN H. M., PENG C. X., HUANG Y. **Epidemiological investigation and genome analysis of duck circovirus in Southern China**. *Virol. Sin.* 26: 289–296, 2011.

WANG D, XIE X, ZHANG D, MA G, WANG X, ZHANG D. **Detection of duck circovirus in China: A proposal on genotype classification.** Vet Microbiol. 147:410–415, 2011.

WOODS IW, LATIMER KS. **Circovirus infection of pigeons and other avian species** In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Dwayne DE, editors. Diseases of Poultry. 11th edn. Iowa State Press. p. 202–211, 2008.

YUASA, N. **Effect of chemicals on the infectivity of chicken anemia virus.** Avian Pathology, v.21, p.315-319, 1992.

YUASA, N. **Isolation of chicken anemia agent with MDCC-MSB1 cells from chickens in the field. National Institute of Animal Health Quarterly (Japan**), v. 23, p. 75- 77, 1983.

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

XIANG, Q. W., X. WANG, Z. J. XIE, Y. N. SUN, Y. L. ZHU, S. J. WANG, H. J. LIU, AND S. J. JIANG. **ORF3 of duck circovirus: A novel protein with apoptotic activity.** Vet. Microbiol. 159:251–256, 2012.

ZHANG , X. **An investigation of duck circovirus and co-infection in Cherry Valley ducks in Shandong Province, China.** Vet. Microbiol. 133:252–256, 2009.

ZHANG, Z.; JIA, R.; LU, Y..; WANG, M. **Identificacion, genotyping, and molecular evolution analysis of duck circovirus**. Gene 529: 288-295, 2013.

# 2 OBJETIVOS

## 2.1 OBJETIVO GERAL

- Contribuir para a melhoria da sanidade avícola através da identificação e caracterização de vírus de impoxxrtância econômica em marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos)*.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar a ocorrência de membros da família *Circoviridae* (Circovírus e Gyrovírus) em marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos)* no estado de Santa Catarina através da técnica de qPCR;
- Quantificar a carga viral nos tecidos amostrados;
- Sequenciar as amplificações de nucleotídeos obtidas;
- Comparar as sequências de nucleotídeos obtidas com outras sequencias disponíveis no GenBank;
- Fazer a análise filogenética dos vírus através das sequencias encontradas;

# CAPÍTULO 2

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS (CAV) E DO GYROVÍRUS AVIÁRIO TIPO 2 (AGV2) EM MARRECOS DE PEQUIM NO ESTADO DE SANTA CATARINA

**Tatiane de F.B.Oliveira[1]; Carlos André da V.L.Rosa[2]; Samuel Cibulski[3]; Taís Fumaco Teixeira[3]**

## RESUMO

O vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) é causador de perdas econômicas significativas, principalmente em produções de frangos de corte, no qual acarreta redução no ganho de peso, alta mortalidade e severa imunossupressão. O gyrovírus aviário tipo 2 (AGV2) se encontra disseminado em plantéis avícolas, porém seu potencial patogênico ainda permanece desconhecido. Diante da ausência de trabalhos visando o controle sanitário de marrecos, e frente às perspectivas de expansão dessa espécie no estado de Santa Catarina, o estudo objetivou verificar, através da técnica de PCR em tempo real, se marrecos de Pequim (Anas platyrhynchos) no estado de Santa Catarina possuem o genoma dos vírus CAV e AGV2, que até o presente momento tem a espécie *Gallus gallus domesticus* primariamente como hospedeiros. Foram analisadas amostras de baço, fígado e bursa de Fabricius de 24 marrecos de Pequim de abatedouro com 8 semanas de idade, criados em aviários integrados nas regiões de Brusque e Jaraguá do Sul. Não foram identificados os genomas de CAV e AGV2 nas amostras de tecidos de marrecos de Pequim. O estudo desses vírus em outras espécies visa ampliar o conhecimento dos aspectos epidemiológicos da doença, como um alerta ao controle sanitário de marrecos de Pequim numa das principais regiões de destaque da avicultura industrial.

**Palavras-chaves: CAV, AGV2, marrecos, qPCR**

---

[1] Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luís de Camões, 2090 - Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brazil.

[2] Departamento de Engenharia e Pesca, Centro de Educação Superior da Região Sul (CERES), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), R. Cel. Fernandes Martins, 270, CEP 88790-000, Laguna, Santa Catarina, Brazil.

[3]Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Avenida Sarmento Leite 500, sala 08, Porto Alegre. CEP 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil.

# 1 INTRODUÇÃO

Os marrecos de Pequim pertencem à ordem dos Anseriformes, família *Anatidae* e gênero *Anas*, sendo explorada comercialmente a espécie *Anas platyrhynchos* (marrecos de Pequim). Originadas da China, são aves muito resistentes e precoces, que aos 60 dias de idade já estão prontas para o abate (AZAMBUJA et al., 2005).

No Brasil, a criação de aves exóticas cresce a cada ano, mas ainda são poucos os criatórios industriais de patos e marrecos no país. Segundo o relatório da UBABEF (2014), a produção brasileira de marrecos no ano de 2012 foi de 228.391 cabeças. Santa Catarina é, atualmente, o maior polo industrial de produção de patos, marrecos e gansos, constituindo 75,6% da produção brasileira, seguido por Minas Gerais com 14,8% e Paraná com 6,4% (ABPA, 2016).

Em Santa Catarina, a criação de marrecos surgiu como uma alternativa de controle natural de pragas e invasoras, bem como fonte de adubação orgânica no solo nas culturas de arroz (AZAMBUJA et al., 2005). Além da criação ao ar livre para controle de arrozais, a produção de marrecos se destaca em Santa Catarina com a presença de abatedouros e criadores. É notável a tradição e o consumo da carne nas regiões do estado, enfatizado pelas festas e a gastronomia típica. A produção dos marrecos de Pequim, embora esteja em expansão, deverá assumir características próprias e certamente a criação intensiva dessas aves, a movimentação e a concentração dos plantéis, poderão favorecer a disseminação de agentes de importância avícola.

O vírus da anemia infeciosa das galinhas (CAV) e o gyrovírus aviário tipo 2 (AGV2) são membros da família *Circoviridae, gênero gyrovírus (*SCHAT, 2009; RIJSEWIJK et al., 2011). O CAV causa a anemia infecciosa das galinhas, mais tipicamente em aves jovens e produz perdas econômicas significativas, principalmente em produções de frangos de corte. 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). O vírus tem sido descrito em todos os países que possuem avicultura comercial (SCHAT e VAN SNATEN, 2008). O AGV2, recentemente descrito, foi isolado em galinhas do sul do Brasil e Holanda, e estudos têm demonstrado que, semelhante ao CAV, o vírus AGV2 também se encontra disseminado em plantéis avícolas, porém seu potencial patogênico ainda permanece desconhecido (RIJSEWUIJK et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

Estudos anteriores pesquisaram o CAV em penas de marrecos de Pequim do norte de Santa Catarina, não encontrando o genoma do vírus, assim como não foi encontrado em amostras de tecido de outras espécies de aves como codornas, patos, avestruzes, pombos e aves silvestres, sugerindo que as galinhas ainda são os únicos hospedeiros para o vírus (COSTA et al., 2013;

GOMES, 2012). Entretanto, um relato de caso mostrou a presença de CAV em amostras de baço e timo de *Forpus Xanthopterygius- Periquito Tuim*, alertando para as pesquisas desse agente em outras espécies que não galinhas (BARRIOS, 2009). FARKAS et al., 1998 sugeriram que soros de codornas Japonesas apresentaram anticorpos contra o vírus da anemia infecciosa das galinhas.

Em relação ao gyrovírus aviário tipo2 (AGV2), além de galinhas domésticas, o vírus já foi encontrado em amostras de outros pássaros (LIMA et al. 2012; SANTOS et al., 2012, dados não publicados). Estudos também relatam que marrecos podem ser portadores de outros vírus que também causam doenças em galinhas, como o paramixovírus aviário tipo 1, causador da Doença de NewCastle e ortomixovírus que causam a Influenza Aviária (SWAYNE e HALVORSON, 2008; NISHIZAWA et al., 2007).

Diante desse contexto, a busca por vírus comuns as duas espécies é fundamental para melhor caracterizar a epidemiologia das doenças que causam tantos prejuízos para avicultura industrial, bem como conhecer o perfil dos agentes envolvidos nas criações de marrecos de Pequim, merecedores de atenção sanitária tanto quanto as galinhas comerciais. Sabendo dessa necessidade e reconhecendo a escassez de trabalhos sobre sanidade em marrecos, é patente a necessidade de maior atenção às criações. Por esses motivos, o presente trabalho teve como objetivo verificar a presença dos vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e o Gyrovírus Aviário Tipo2 (AGV2) em amostras de tecidos de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina através da técnica de PCR em tempo real.

# 2 MATERIAL E MÉTODOS

## 2.1 AMOSTRAS

Para investigar a presença do genoma dos vírus CAV e AGV2 em marrecos de Pequim, foram coletadas 24 amostras de bursa, de baço e de fígado (totalizando 72 amostras) de marrecos de Pequim com 8 semanas de idade em abatedouro na cidade de Brusque-SC, criados em aviários integrados da região de Brusque e Jaraguá do Sul. As aves abatidas eram clinicamente saudáveis, sem lesões significativas, porém oriundas de lote com alta mortalidade na primeira semana e baixo ganho de peso. Marrecos de Pequim não são comumente vacinados contra nenhuma doença aviária. As amostras mediam aproximadamente 1cm e foram estocadas separadamente em sacos estéreis a -20$^{o}$C.

## 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA VIRAL

O método de extração de DNA utilizado foi o iodeto de sódio seguido de clorofórmio/álcool isoamílico conforme protocolo estabelecido por TEIXEIRA et al. (2013).

Foram pesadas 0,025 g de cada amostra e posteriormente trituradas. Os tecidos foram colocados em 885 µL de tampão de lise (800µL TEN 2x; 80 µL SDS 10%; 5 µL proteinase K). As amostras foram incubadas por 4 horas a 37$^{o}$C. Posteriormente foram centrifugadas a 8000 rpm durante 2 minutos e 300 µL de sobrenadante foram transferidos para um novo tubo. Foram adicionadas 300 µL de iodeto de sódio (NaI 6M) e 600 µL de clorofórmio com álcool isoamílico. Foi agitado e centrifugado a 8000 rpm por 5 min. Foi coletado 500 µL do sobrenadante e transferido para outro tubo. Foram adicionados 500 µL de clorofórmio com álcool isoamílico. Foi centrifugado a 8000 rpm por 5 min. Foi coletado 400 µL do sobrenadante e acrescentado 1 ml de etanol absoluto gelado. Foi incubado a -20$^{o}$C por 30 min. Posteriormente, foi centrifugado a 14.000 rpm por 20 min. Desprezou-se todo o sobrenadante e ressuspendeu o DNA em 50 µL TE e 0,5 µL de RNAase. Foi incubado a 37$^{o}$C por 30 min. A quantidade e a qualidade do DNA foi verificada por espectofotometria (*Nanodrop 1000*).

## 2.3 DETECÇÃO DE CAV E AGV2 POR qPCR

As amplificações do DNA do CAV e do AGV2 foram realizadas através de qPCR utilizando os iniciadores e sondas de acordo com VARELA et al. (2014) (Tab. 1). Os ensaios foram realizados no Termociclador *StepOne Real Time*, em volume de 12,5 µL. Foram utilizados 100ng do DNA

extraído dos tecidos em cada reação, 6,25µl de 2x *Universal Taqman Master Mix* e 0,2µmol de cada iniciador e sonda. As reações foram realizadas em conjunto para o CAV e para o AGV2 (previamente padronizadas), com um ciclo de desnaturação inicial (95ºC, 10 min), seguido por 40 ciclos de 95ºC, 15s. (desnaturação), 60ºC, 1 min. (anelamento e extensão). A aquisição da fluorescência foi realizada no final de cada ciclo de extensão.

Tabela 1 - Iniciadores e sondas utilizados para a detecção de CAV e AGV2 pela técnica de qPCR.

| Iniciador/Sonda | Sequência 5´ - 3´ |
|---|---|
| *CAV Forward* | CCAGCTTGCGTGCTATTCAT |
| *CAV Reverse* | CGAGCAACAGTACCCTGCTA |
| *CAV Probe* | JOE-ACAGCGCAAGGCACGCAAGT-BHQ |
| *AGV2 Forward* | CACGGGCAAGACACTAAATG |
| *AGV2 Reverse* | TATCGAGGTCGTTTCTGCTG |
| *AGV2 Probe* | FAM-CGCTCTCGCCGACAAGCAAC-BHQ |

## 2.4 AMPLIFICAÇÃO POR PCR CONVENCIONAL DAS AMOSTRAS QUE AMPLIFICARAM POR qPCR

Com o objetivo de amplificar um fragmento de DNA maior, foi realizada uma PCR convencional das amostras que amplificaram para CAV e AGV2 por qPCR.

As amplificações de DNA do CAV e do AGV2 por PCR convencional foram realizadas em um volume total de 25 µL. Cada reação de PCR continha: 0,75µL 50mM $MgCl_2$, 2,5µL 10x PCR buffer, 10 pM de *primers* iniciadores, 1,25 U Taq DNA polimerase, 2,0µL 10mM dNTP, 100 ng de DNA da amostra e 18,5µL de água Milli-Q estéril. As amplificações foram executadas em termociclador *Veriti PCR System* (*Applied Biosystems*). As reações foram realizadas separadamente para o CAV e para o AGV2, com um ciclo de desnaturação inicial (94ºC, 5 min), seguido por 40 ciclos de 94ºC, 30s. (desnaturação), 52ºC, 30s. (anelamento), 72ºC, 60s. (extensão) e um ciclo final de extensão de 5 minutos a 72°C. Para o CAV foram usados os *primers* iniciadores PF 5´-TGC CAG ACC CCC AAT CTA CTA - 3´ e o PR 5´-AAG CGG GTT TCA ATG TGT CG-3´, que amplificam um fragmento de 448 pares de bases (pb). Para o AGV2 foram utilizados os seguintes *primers* iniciadores: PF 5´- CGT GTC CGC CAG CAG AAA C -3´ e PR 5´-GGT AGA AGC CAA

AGC GTC CAC -3´ que amplificam um fragmento de 345 pb, conforme descrito por RIJSEWIJK et al. (2011). A visualização dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese através de gel de agarose 2% com 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

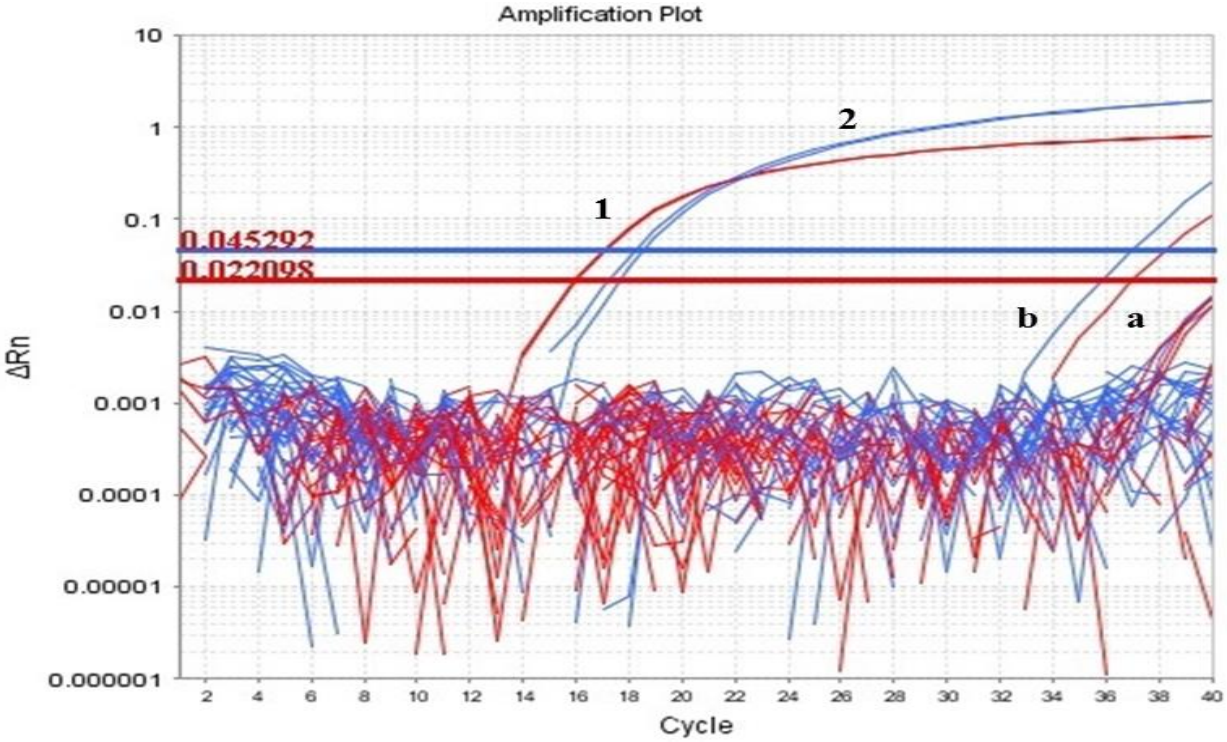
## 2.5 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS AMPLIFICADAS POR qPCR E PCR CONVENCIONAL

As amostras amplificadas pelas técnicas de qPCR e PCR convencional foram determinadas utilizando um "kit" comercial (*DYEnamic™ ET termination kit, GE - Healthcare*). As reações de sequenciamento foram analisadas pelo sequenciador automático *MegaBACE™ 500* (*GE Healthcare*). As sequências de nucleotídeos foram analisadas com o programa Geneious versão 8.0. Para análise das possíveis identidades (caracterização taxonômica preliminar) das sequências encontradas, foi utilizada a ferramenta Blastn (Nucleotide Blast), disponível no portal do NCBI. As sequencias nucleotídicas foram alinhadas com sequencias homólogas disponíveis no GenBank colhidas através da ferramenta Blastn.

## 3 RESULTADOS

Do total de 72 amostras testadas por qPCR, uma amostra de bursa de Fabricius amplificou para CAV, representando 1,4% das amostras analisadas. E uma amostra de fígado foi amplificada para AGV2 (1,4%) conforme Figura 1. Cabe salientar que todo o procedimento foi repetido, obtendo-se o mesmo resultado.

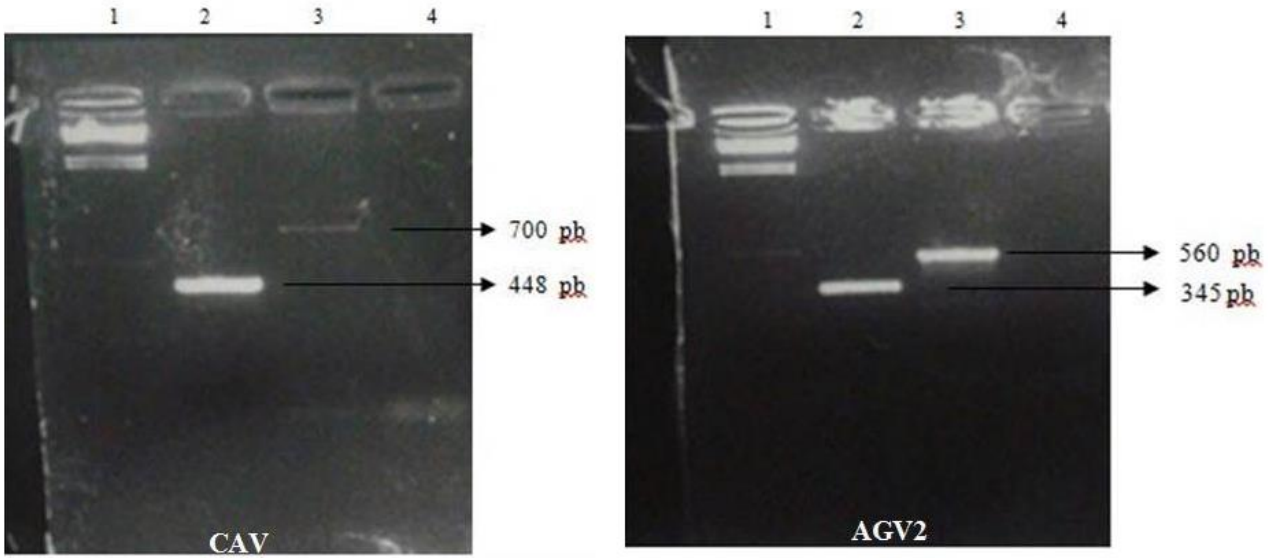
Figura 1 - *Screening* das amostras de baço, bursa de Fabricius e fígado para CAV e AGV2 pela técnica de qPCR.




1) Controle positivo CAV. 2) Controle positivo AGV2. a) amostra de fígado amplificada para CAV. b) amostra de bursa de Fabricius amplificada para AGV2

Em relação a PCR convencional das amostras positivas para CAV (Bursa de Fabricius) e AGV2 (fígado) por qPCR, não foram observadas amplificações de tamanhos esperados de fragmento de DNA para CAV e AGV2 (Figura 2), sendo que na eletroforese para AGV2 observou-se a amplificação de uma banda inespecífica, com tamanho maior que o esperado de fragmento de DNA. Os resultados de sequenciamento confirmaram que os genomas amplificados das amostras de bursa de Fabricius e fígado, não são referentes aos vírus CAV e AGV2, respectivamente.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose 2% das amostras amplificadas de CAV e AGV2 por PCR.




(1) Marcador molecular *Lambda x Hind III*; (2) controle positivo; (3) amostras positivas bursa de Fabricius (CAV) e fígado (AGV2); (4) controle negativo

# 4 DISCUSSÃO

As consequências dos gyrovírus aviários para a indústria avícola, como o vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV), impõem que os estudos epidemiológicos sejam cada vez mais necessários, pois as altas mortalidades, a redução de ganho de peso e a severa imunossupressão, principalmente em frangos de corte nas primeiras semanas de vida, acarretam perdas econômicas significativas. Os dados são mais factíveis quando se trata do vírus CAV, pois a doença e os prejuízos para as aves já estão bem caracterizados, enquanto AGV2, foi recentemente descoberto (RIJSEWUIJK et al., 2011) e investigações ainda estão sendo realizadas para conhecer o seu potencial patogênico, que ainda permanece desconhecido.

Mesmo diante de dados sugestivos da ocorrência dos gyrovírus aviários em outras aves domésticas que não galinhas (LIMA et al. 2012; SANTOS et al. 2012, dados não publicados), como a presença de anticorpos para o vírus CAV em soros de codornas Japonesas (Coturnix coturnix japônica) (FARKAS et al., 1998) e em amostras de baço e timo de um periquito (*Forpus Xanthopterygius - Periquito Tuim)* (BARRIOS, 2009), no presente estudo não foi possível identificar a presença dos vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e Gyrovírus Aviário Tipo 2(AGV2) em amostras de tecidos de bursa de Fabrícius, fígado e baço de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina. Porém, cabe salientar que o estudo aqui apresentado foi realizado em apenas duas regiões de Santa Catarina, o que pode ser considerado como sendo uma amostragem pequena, e também por se tratar de criações isoladas de marrecos de Pequim, sem nenhum outro criatório nas proximidades. Fato esse pode ser comparado com a ocorrência do vírus CAV em amostra de timo de uma ave de fauna (*periquito TUIM*), onde a autora sugere que a proximidade do criatório em conjunto com criações de galinhas e intercâmbio de fômites e tratadores pode ter facilitado a transmissão (BARRIOS, 2009).

A reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), a qual foi utilizada no presente estudo, é considerada uma técnica muito sensível e bastante útil para diagnóstico (SEGALÉS et al., 2005), e vem sendo muito utilizada no diagnóstico de circoviroses (VARELA et al., 2014; ZHENG LI et al., 2013; VILCEK et al., 2010; WAN et al., 2010;). Também pela qPCR estudos anteriores pesquisaram o CAV na base da pena (cálamo) de marrecos de Pequim oriundos do norte Catarinense, e também não encontraram o genoma do vírus (Costa et al., 2013). Logo, os nossos dados corroboram esses resultados sugerindo que os gyrovírus afetem primariamente *Gallus gallus domesticus.*

Sendo Santa Catarina, região de destaque na avicultura industrial e na expansão de criatórios e abatedouros de marrecos de Pequim, a possibilidade de detecção dos genomas dos vírus CAV e

AGV2 em marrecos seria um alerta ao maior controle sanitário dessa espécie na região, que por sua vez tem-se verificado uma menor preocupação quando comparamos ao controle sanitário de galinhas. Isso se deve principalmente pela ausência de registros e de informações sobre as condições sanitárias que marrecos são criados em Santa Catarina.

As aves do presente estudo eram marrecos com 8 semanas de idade, clinicamente saudáveis e oriundos de aviários integrados com histórico de alta mortalidade na primeira semana e baixo ganho de peso. A princípio suspeitou-se de doença imunossupressora, visto as características bem elucidadas em galinhas. Sabe-se que o vírus CAV cursa com doença clínica mais severa em aves de até 3 semanas de idade, que desenvolvem imunossupressão com agravamento de outras enfermidades, infecções secundárias, mortalidade variável e retardo no crescimento (YUASA *et al*., 1979; YUASA e IMAI,1986) e em aves adultas cursa como doença subclínica. Duas explicações podem ser apontadas nessa questão: a primeira sugere que a mortalidade de marrecos de primeira semana e baixo ganho de peso deve-se provavelmente a manejo incorreto. Pode-se afirmar que após melhorias dos aviários envolvidos nessa pesquisa, principalmente na construção de novos bebedouros, retirada das aves com limpeza e desinfecção total e aumento de vazio sanitário, o problema de mortalidade de primeira semana e o baixo ganho de peso foi solucionado nos lotes posteriores. Outra questão que pode ser levantada seria a especificidade dos circovirus. No Brasil não há relatos de circoviroses em marrecos ou patos, porém em países como China e Hungria tem sido detectada alta prevalência de circovirus dos patos (DuCV) com características semelhantes ao vírus CAV (CHA et al., 2014; WANG et al., 2011; FRINGUELLI et al., 2005). Levando em consideração tais características, como a presença do vírus em aves saudáveis e o potencial imunossupressivo do vírus, pesquisas com DuCV em marrecos seriam necessárias para o conhecimento de agentes envolvidos em marrecos de Pequim.

Nesse contexto, é importante mencionar que marrecos podem ser afetados por vários outros microorganismos, resultando em doenças clínicas e/ou subclínicas, que são importantes para epidemiologia dos agentes e que podem ser transmitidas para galinhas, o que gera preocupação no setor avícola. Algum desses agentes são de extremo impacto na avicultura industrial como o vírus da Influenza Aviária (SWAYNE e HALVORSON, 2008), Doença de New Castle (NISHIZAWA et al., 2007) e as Circoviroses (ZHANG et al., 2009; WAN et al., 2011), como já mencionada anteriormente. Sendo assim, marrecos podem atuar como portadores de vários agentes virais, consequentemente contribuindo para o surgimento de novas amostras patogênicas e sua disseminação entre aves domésticas e comerciais (LIMA, 2005). Mesmo com poucos criatórios industriais de marrecos no Brasil, a criação de aves de subsistência e o comércio de aves vivas,

carne e ovos são comuns no país, o que torna essa espécie merecedora de atenção sanitária tanto quanto galinhas comerciais.

Mesmo não identificando os gyrovírus aviários em amostras de tecidos de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina, esse trabalho, além de contribuir para ampliar os aspectos epidemiológicos dos gyrovírus, serve como incentivo à realização de mais estudos na área de sanidade de marrecos de Pequim, frente a sua perspectiva de expansão. Caracterizar a epidemiologia desses vírus que causam tantos prejuízos para avicultura industrial, poderá contribuir para as melhorias nas práticas de controle e prevenção de agentes de impacto sanitário. A infecção do vírus da anemia infecciosa das galinhas, bem como Gyrovírus Aviário Tipo 2 em outras espécies, que não *Gallus gallus domesticus* ainda não estão bem elucidados. Fica o alerta para o controle sanitário nas criações de marrecos de Pequim.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAMBUJA, M.O.; PETTINE, L.J. **Controle Biológico de Pragas e Invasoras do Arroz Irrigado com o Marreco-de-Pequim**. Extensão Rural e Desenvolvimento Sustentável. Porto Alegre, v.1 n.4, 2005.

BARRIOS, P. **Detecção do vírus da anemia infecciosa das galinhas.** 58 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.

CHA S.Y.; SONG ET AL. **Prevalence of duck circovirus infection of subclinical pekin ducks in South Korea**. J Vet Med Sci. ;76:597–99, 2014.

COSTA et al. **Diagnóstico de anemia infecciosa das galinhas em marrecos de Pequim por PCR em tempo real**. In: Jornada de Iniciação Científica- JINC, 7. Anais...Concórdia: Embrapa, p.17, 2013.

FARKAS, T.; MAEDA,K.; SUGIURA,H.;KAI,K. **A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia vírus (CAV) in Japan.** Vol.27, n.3, p.316-320, 1998.

FRINGUELLI E., SCOTT A., BECKETT A., MCKILLEN J., SMYTH J., PALYA V., GLAVITS R., IVANICS E., MANKERTZ A., FRANCIOSINI M. **Diagnosis of duck circovirus infections by conventional and real-time polymerase chain reaction tests.** *Avian Pathol.* 34: 495–500, 2005.

GOMES, S. **Anemia infecciosa das galinhas em Minas Gerais: diversidade genética e epidemiologia molecular**. 2012. 96 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2012.

LIMA, F.E.S. et al. **Detection of avian gyrovirus type 2 in an Alagoas Curassow (Mitu mitu)**. In: Brazilian Congress of Virology, 23., Mercosul Meeting of Virology, 7., 2012.

NISHIZAWA, M., A.C. PAULILLO, L.S.O. NAKAGI, A.D. NUNES, J.M. CAMPIONI AND L. DORETTO JÚNIOR. **Newcastle disease in White Pekin Ducks: response to experimental vaccination and challenge**. Brazilian J. Poult. Sci., 9: 77-79, 2012.

RIJSEWIJK, F.A.M., et al. **Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus**. Archive Virology, v. 156, p. 1097-1100, 2011.

ROSENBERGER, J.K., CLOUD, S.S., **Chicken anemia virus**. Poult. Sci. 77, 1190-1192, 1998.
SANTOS, H.F., et al. **Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands**. Veterinary Microbiology, v. 155, p. 230-236, 2012.

SCHAT, K. A. & van SANTEN, V. L. **Chicken infectious anemia**. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; CLISSON, J. R.; McDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. Diseases of Poultry.12th ed. Ames: Blackwell Publishing, p. 209-235, 2008.

SEGALE'S J, ALLAN GM, DOMINGO M. **Porcine circovirus diseases**. Anim Health Res Rev. 6:119–142, 2005.

SHAT KA. **Chicken anemia vírus**. Curr top Microbiol Immnunol 331:151-183, 2009.

SWAYNE, D. E; HALVORSON, D. A. Influenza. In: SAIF, Y. M.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MCDOUGALD, L. R.; NOLAN, L. K.; SWAYNE, D. E. 2008. **Diseases of Poultry**. Iowa: Iowa State University Press. cap.6, p.153- 184, 2008.

TEIXEIRA, T.F. **Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome.** Virus Genes , v.47, p.276–281, 2013.

VARELA, A.P.M, et al. **Chicken anemia virus and avian gyrovirus 2 as contaminants in poultry vaccines.** Biologicals, v. 42, p. 346-450, 2014.

VILCEK,S., M. VLASAKOVA, and A. Jackova, **LUX real-time PCR assay for the detection of porcine circovirus type 2.** Journal Virol.Methods 165, 216-221, 2010.

WAN ET AL., WAN C. H., FU G. H., SHI S. H., CHENG L. F., CHEN H. M., PENG C. X., HUANG Y. **Epidemiological investigation and genome analysis of duck circovirus in Southern China**. *Virol. Sin.* 26: 289–296, 2011.

WANG D, XIE X, ZHANG D, MA G, WANG X, ZHANG D. **Detection of duck circovirus in China: A proposal on genotype classification.** Vet Microbiol. 147:410–415, 2011.

YUASA N, IMAI K. **Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anemia agent**. Avian Pathology . 15(4): 639-645, 1986.

YUASA, N.; IMAI, K.; TEZUCA, A. H. **Survey of antibody against chicken anaemia agente (CAV) by an indirect immunofluorescent antibody technique in breeder flocks in Japan.** Avian Pathology, v. 14, p. 521-530, 1985.

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

ZHANG, Z.; JIA, R.; LU, Y.; WANG, M.; ZHU, D.; CHEN, S.; YIN, Z.; CHEN, X.; CHENG, A. . **Identification, genotyping, and molecular evolution analysis of duck circovirus**. Gene [on line], Amsterdam, v. 529, n.1, p.288-295, 2013.

# CAPÍTULO 3

## IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CIRCOVÍRUS DOS PATOS (DUCV) EM MARRECOS DE PEQUIM NO ESTADO DE SANTA CATARINA

**Tatiane de F.B.Oliveira[1]; Carlos André da V.L.Rosa[2]; Samuel Cibulski[3]; Taís Fumaco Teixeira[3]**

## RESUMO

O vírus DuCV pertence a familia *Circoviridae*, gênero circovírus, e tem sido detectado em patos e marrecos de diversas regiões da Hungria, Taiwan, Estados Unidos, China, Coreia do Sul e Polônia, podendo evidenciar tanto desordens de plumagens, baixo peso e severa imunossupressão como nenhuma sintomatologia clínica. Santa Catarina se destaca na criação de marrecos de Pequim, porém a escassez de estudos sanitarios é preocupante frente as perspectivas de crescimento na região. O objetivo desse trabalho foi detectar e quantificar o genoma de DuCV em amostras de baço, bursa de Fabricius e fígado de 97 marrecos no estado de Santa Catarina, oriundos de matrizeiros, aviários integrados e abatedouros, utilizando a técnica de PCR em tempo real. O ensaio foi capaz de detectar aproximadamente um mínimo de 100 cópias de genoma (por GC) por reação, demostrando que a técnica de qPCR foi altamente sensível para detectar DuCV em amostras de tecidos de marrecos de Pequim. Das 97 aves testadas, em 86 (89%) foi possível detectar o genoma de DuCV em ao menos um dos tecidos coletados. Em 100% das aves amostradas das regiões de Brusque e Jaraguá do Sul, com 2 semanas e 8 semanas de idade, foi possível detectar o genoma de DuCV, enquanto que em matrizes da região de Araquari, com 22 semanas de idade, foi detectado o genoma viral em 21% das aves testadas. Das 291 amostras de tecidos coletadas, 234 (80%) foram positivas para o vírus. Observou-se que matrizes de marrecos de Pequim apresentaram carga viral significativamente menor quando comparado aos aviários integrados e abatedouro ($p<0,05$). A quantificação viral nos tecidos avaliados mostraram resultados superiores a $10^{14}$ cópias de DNA de DuCV/ml em amostras de marrecos de Pequim entre 2 e 8 semanas de idade. Não houve diferença significativa quanto à carga viral nos diferentes tecidos (bursa, baço e fígado) ($p>0,05$). Os resultados desse trabalho alertam para o controle sanitário nas criações de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina, bem como incentiva novos estudos nessa espécie.

**Palavras-Chave**: marrecos de Pequim, qPCR, DuCV, circovírus

---

[1] Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Av. Luís de Camões, 2090 - Conta Dinheiro, CEP 88520-000, Lages, Santa Catarina, Brazil.

[2] Departamento de Engenharia e Pesca, Centro de Educação Superior da Região Sul (CERES), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), R. Cel. Fernandes Martins, 270, CEP 88790-000, Laguna, Santa Catarina, Brazil.

[3]Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Avenida Sarmento Leite 500, sala 08, Porto Alegre. CEP 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil.

# 1 INTRODUÇÃO

Os circovírus possuem vírions icosaédricos, sem envelope, com 14 a 26nm de diâmetro. O genoma DNA circular de fita simples (1.7-2.3kb) é um dos menores entre os vírus animais (Todd, 2000). Atualmente, a família *Circoviridae* compreende o gênero ***Gyrovirus***, o qual inclui o vírus da anemia infecciosa das galinhas *(*CAV- *Chicken Anemia Virus*) (Todd., 2000) e o Girovírus Aviário tipo 2 (AGV2- *Avian Gyrovirus 2)* (RIJSEWIJK et al., 2012) e o gênero ***Circovírus***, que inclui, dentre outros vírus, o *Porcine Circovírus tipo 2* (PCV2), *Goose Circovirus* (GoCV), *Canary Circovirus* (CaCV) (PHEIX et al., 2001) e o *Duck Circovírus* (DuCV) (HATTERMANN et al., 2003).

O DuCV foi primeiramente isolado de tecido de Bursa de Fabricius em patos Mulard (híbrido de *Cairina moschata* × *Anas platyrhynchos*) de fazendas na Alemanha (HATTERMANN et al., 2003). Desde então, DuCV tem sido detectado em patos Muscovy *(Cairina moschata)*, Marrecos de Pequim *(Anas platyrhynchos)*, patos Mulard e patos de vida livre (*Melanitta fusca*) em regiões da Hungria, Taiwan, Estados Unidos, China, Coreia do Sul e Polônia (MATCZUK et al., 2015; CHA et al., 2013; ZHANG et al., 2009; BANDA et al., 2007; CHEN et al., 2006; FRINGUELLI et al., 2005).

Os circovírus aviários são associados, geralmente, à doença subclínica ou caracterizados por infecções concomitantes como consequência do comprometimento da resposta imune (BANDA et al., 2007; FRINGUELLI et al., 2005). Infecção e coinfecção por DuCV são muito comuns nos criatórios de marrecos e patos, principalmente nas regiões da China, e têm sido relacionadas às aves jovens com desordens de plumagem, baixo ganho de peso e severa imunossupressão. Em outros casos, o vírus também tem sido detectado em animais sem nenhum sintoma clínico. Em relação às coinfecções, DuCV pode predispor a outras doenças e infecções com *Riemerella antipestifer*, *Pasteurella multocida*, *Staphilococcus aureus*, Vírus da hepatite dos patos (DHV) e Salmonelas (CHA et al., 2014; ZHANG et al., 2009; BANDA et al., 2007; SOIKE et al., 2004).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para o diagnóstico de DuCV, como a reação da cadeia de polimerase convencional (PCR), nested PCR, hibridização em situ (ISH) e PCR em tempo real (MATCZUK et al., 2015; CHA et al., 2013; WAN et al., 2011; FRINGUELLI et al., 2005). Nos últimos anos, técnicas de qPCR têm sido padronizadas para o diagnóstico de DuCV, sendo considerado um excelente diagnóstico por ser uma técnica altamente sensível e específica. A qPCR tem a capacidade de quantificar a carga viral das amostras clínicas, o que proporciona maior entendimento das infecções pelo DuCV (WAN et al., 2011; FRINGUELLI et al., 2005).

No Brasil ainda não existem relatos de DuCV em criatórios de patos e marrecos, tão pouco estudos sobre sanidade nessas espécies. A falta de informações é preocupante frente às perspectivas de expansão de marrecos de Pequim em Santa Catarina, onde a criação intensiva dessas aves, a movimentação e a concentração dos plantéis poderão favorecer a disseminação de agentes de importância avícola.

Diante desse contexto, esse trabalho foi conduzido para investigar a presença de DuCV em marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina, considerando sua importância e perspectivas de crescimento nessa região. Para tal pesquisa, foi padronizada uma qPCR para detectar e quantificar o genoma de DuCV em baço, bursa de Fabricius e fígado de marrecos de Pequim oriundos de matrizeiros, aviários integrados e abatedouros.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 AMOSTRAS

Amostras de tecidos de marrecos de Pequim, clinicamente saudáveis, foram coletadas durante o ano de 2015 de granja matriz e de aviários integrados e abatedouros de regiões produtoras de marrecos, no estado de Santa Catarina (Araquari, Brusque e Jaraguá do Sul). Fragmentos de três órgãos (baço, bursa de Fabricius e fígado) foram coletados de 97 marrecos de Pequim, sendo 14 aves oriundas de aviário de granja matriz de Araquari (22 semanas), 15 aves de aviários integrados (2 semanas) e 68 aves de abatedouros (8 semanas), de Brusque e Jaraguá do Sul (Tabela 1). A fim de detectar diferenças na carga viral entre as idades dos marrecos, as aves com duas e oito semanas foram oriundas de mesmo lote. Entretanto, 23 aves coletadas nos abatedouros foram provenientes de lotes em que não foi possível coleta de amostras em marrecos com duas semanas. Tais aves apresentavam histórico de alta mortalidade nas primeiras semanas de criação (em média 20%) e redução no ganho de peso.

Tabela 1 - Amostras provenientes de matrizes, aviários integrados e abatedouros de Araquari, Brusque e Jaraguá do Sul, SC.

| Grupos | Nº Aves Total |
|---|---|
| **Matrizes** | **14** |
| **Aviário 2sem[1]** | **6** |
| **Aviário 2sem[2]** | **9** |
| **Abatedouro[3]** | **24** |
| **Abatedouro[4]** | **21** |
| **Abatedouro[5]** | **23** |
| **Total** | **97** |

[1]Aviário Integrado de Brusque
[2]Aviário Integrado de Jaraguá do Sul
[3]Aves abatidas do lote alojado em Brusque
[4]Aves abatidas do lote alojado em Jaragua do Sul
[5]Aves de Brusque e Jaragua do Sul com histórico de alta mortalidade e redução no ganho de peso

Os marrecos não foram vacinados para nenhum agente. O manejo dos matrizeiros apresenta maior nível de biosseguridade, com baixo fluxo de pessoas, ausência de mistura de aves com idades diferentes no mesmo aviário e maior período de criação das aves (75 semanas), quando comparado aos aviários integrados (oito semanas). Na saída dos lotes de matrizes, todos os aviários são lavados e desinfetados, ocorrendo troca de cama a cada lote alojado e vazio sanitário de 30 dias. Os aviários integrados realizam limpeza e desinfecção total com troca de cama após o alojamento de seis lotes. Porém, ocorre vazio sanitário a cada saída das aves de 10 dias. Nos aviários integrados ocorre mistura de aves com diferença de 30 dias de idade, dentro do mesmo aviário, separadas por divisórias de madeira. Salienta-se também o grande fluxo de pessoas. Todos os aviários, matrizes e integrados, são monitorados periodicamente para salmoneloses e micoplasmoses, mantendo resultados negativos. Para a eutanásia das aves utilizou-se o método de deslocamento cervical, conforme descrito e enviado ao *COMITÊ* de *ÉTICA* em Experimentação Animal da *UDESC* - CETEA. Todas as amostras coletadas foram estocadas a - 20$^{o}$C até a extração de DNA.

## 2.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada seguindo o protocolo estabelecido por Teixeira et al. (2013). Os fragmentos de tecidos (25 mg) foram colocados em 885µL de tampão de lise Tris-HCl 20 *(Invitrogen)*, pH 8,0; 2 mM de EDTA *(Invitrogen)*, pH 8,0, 300 mM de NaCl (*Nuclear*),100 µg proteinase K *(USB Corporation)*, 1% de SDS *(Promega)* e incubados durante 4 h a 37$^{o}$ C. Após

isto, a mistura foi centrifugada a 12,000 x g durante 1 min e 300 µL de sobrenadante transferida para um novo tubo. O DNA foi extraído com 6 M Nal e clorofórmio / álcool isoamílico. Após precipitação com etanol, o DNA foi seco e ressuspenso em 50 µL TE (10 mM Tris pH 7,4; EDTA 1 mM, pH 8,0) contendo RNase. A quantidade do DNA foi verificada por fluorometria (*Qubit, Invitrogen*) e a qualidade por espectrofotometria (*Nanodrop, Thermo*).

## 2.3 PADRONIZAÇÃO DA QPCR PARA DETECÇÃO DE DUCV

Pares de primers foram projetados de acordo com uma sequência referência de DuCV depositada no GenBank. Os oligonucleotídeos foram projetados utilizando o software GENEIOUS (*Geneious Software* versão 8.0) para amplificar a região mais conservada do genoma viral - gene *Rep* (*Open Reading Frame 1* – ORF1). O primer *forward* foi PF: DUCV_F 5´ - ACT TAT GTT ATC TTT GGG CGT GG – 3´ (posição no genoma 454-476 nt para AY_228555.1) e o primer *reverse* PR: DUCV_R 5´- GTA ATA CTT GTT TTC GGC GGG A – 3´ ( posição no genoma 588-609 nt para AY_2285551) . Estes foram destinados a dar origem a um fragmento amplificado de 150pb.

Foram selecionadas amostras aleatórias de fragmentos de tecidos de bursa de Fabricius, baço e fígado de marrecos de Pequim abatidos com oito semanas e marrecos matrizes com 22 semanas, totalizando 11 amostras. Após extração e quantificação de DNA viral foi realizada uma *screening* com a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR).

A qPCR foi realizada como se segue: em 15µl de volume de reação foram utilizados 100ng de DNA, 200nM de cada primer e 7,5 µl de *Fast EvaGreen qPCR Master Mix* (*Biotium*). As condições de reação foram: 95$^{o}$C por 2 min seguidos de 40 ciclos de 95ºC durante 5 seg e 60$^{o}$C durante 30 segundos. Ao final dos 40 ciclos foi realizada uma curva de dissociação (*curva de Melting)* de 60$^{o}$C até 95$^{o}$C com incrementos de 1$^{o}$C.

Os controles negativos usados na qPCR consistiam em água destilada no lugar de DNA. As amostras amplificadas pela qPCR foram destinadas a eletroforese em gel de agarose para verificação do tamanho amplificado. Um dos fragmentos foi ligado no plasmídeo pCR2.1 e estes foram utilizados para a transformação de células competentes de *E. coli* TOP10 (*Invitrogen*). A clonagem dos fragmentos amplificados foi realizada segundo o protocolo do *TOPO® TA Cloning® Kit®* (*Life Technologies*). A extração do DNA plasmidial das colônias foi feita seguindo protocolos padrão (SAMBROOK & RUSSEL, 2001). Após a confirmação da presença do inserto de interesse, os plasmídeos foram purificados usando o kit de purificação de *DNA GFX$^{TM}$* (*GE Healthcare*) e

foram sequenciados (conforme descrito posteriormente) para confirmação da amplificação do DuCV, obtendo-se assim o controle positivo viral.

Para construção de uma curva padrão para qPCR, o DNA plasmidial foi quantificado em espectrofotômetro (*Qubit, Invitrogen*), e diluições (10x) foram realizadas de forma a obter uma curva (1 a $10^9$ moléculas). A curva foi aplicada no termociclador Rotor Gene Q (*Quiagen*) para quantificação das amostras e assim determinar a sensibilidade e a eficiência da amplificação da qPCR. Com a qPCR padronizada, as demais amostras do presente estudo foram testadas para detecção e quantificação de DuCV.

## 2.4 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Além da clonagem para obtenção do controle positivo de DuCV e construção da curva padrão para o qPCR, também foram clonados, posteriormente, outros fragmentos oriundos da qPCR de amostras positivas para posterior sequenciamento e análise filogenética. As sequências dos insertos clonados foram determinadas utilizando um "kit" comercial (*DYEnamic™ ET termination kit, GE - Healthcare*). As reações de sequenciamento foram analisadas pelo sequenciador automático *MegaBACE™ 500* (*GE Healthcare*).

As sequências de nucleotídeos foram analisadas com o programa Geneious versão 8.0. Para análise das possíveis identidades (caracterização taxonômica preliminar) das sequências encontradas, foi utilizada a ferramenta Blastn (Nucleotide Blast), disponível no portal do NCBI. As sequencias nucleotídicas foram alinhadas com sequencias homólogas disponíveis no Gen Bank colhidas através da ferramenta Blastn. Análises Filogenéticas das sequencias de nucleotídeos foram realizadas usando o método Neighbor-Joinning (NJ) (SAITOU et al., 1987) do software MEGA5 (TAMURA et al, 2011), baseado nos parâmetros de KIMURA.

## 2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise estatística da quantificação viral, as amostras dos tecidos foram agrupadas em seis diferentes grupos: tecidos de marrecos matrizes- Araquari/SC, marrecos de duas semanas e oito semanas de Brusque/SC, marrecos de duas semanas e oito semanas de Jaraguá do Sul/SC e marrecos de oito semanas de Brusque e Jaraguá do Sul com histórico de alta mortalidade e redução de ganho de peso.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado em arranjo fatorial 6x3 (grupos e órgãos). Os dados foram submetidos à ANAVA e posteriormente ao teste comparativo de médias por Tukey 5%, utilizando o programa *XVI StatGraphics Centurion*.

# 3 RESULTADOS

## 3.1 ANÁLISE DO DESEMPENHO DA qPCR PARA DETECÇÃO DE DuCV

A sensibilidade da qPCR para DuCV foi avaliada utilizando um plasmídeo portador de um fragmento do genoma DuCV. O ensaio foi capaz de detectar aproximadamente um mínimo de 100 cópias de genoma (por GC) por reação. A correlação linear média ($R^2$) foi de 0,99 e a eficiência de amplificação média (Eff%) da qPCR no DNA plasmidial contendo o segmento alvo foi de 93% (Figura 1). A curva de dissociação (*"Curva de Melting"*) dos produtos de amplificação foi de aproximadamente 85,8 °C e deu origem a um pico único, confirmando a especificidade do ensaio (Figura 2).

Figura 1- Padronização de qPCR para detecção de genoma de circovírus dos patos (DuCV): Curva Padrão construída com base na quantidade de cópias de DNA de DuCV x Ct obtido na reação de qPCR. Diluições seriadas na base 10 ($10^1$ a $10^9$) de plasmídio contendo o segmento clonado de DuCV foi usado como modelo para construção da curva.

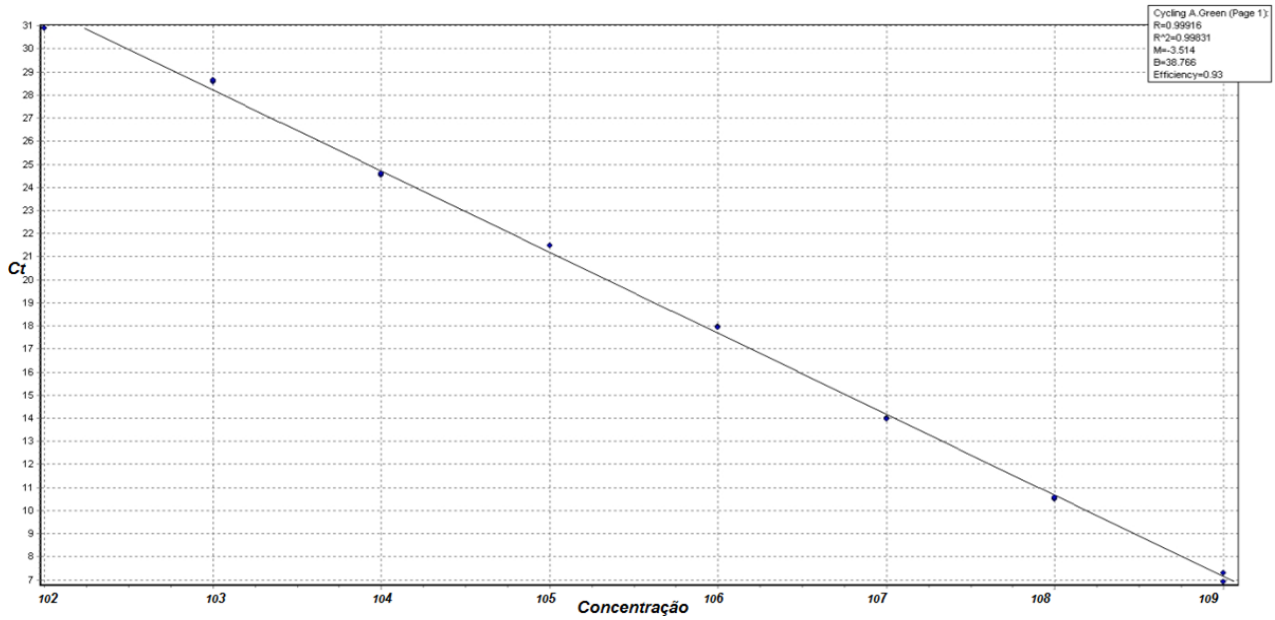
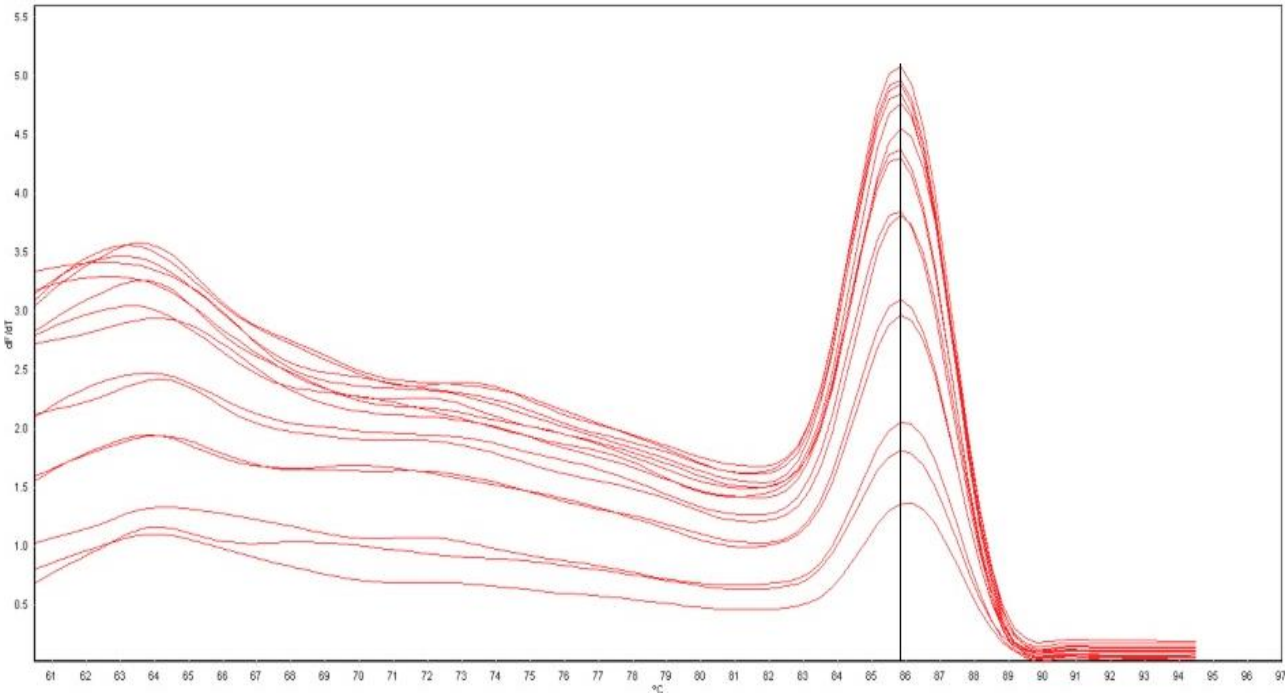


Figura 2 - Padronização de qPCR para detecção de genoma de circovírus dos patos (DuCV): B) Curva de dissociação "*Curva de Melting*" de qPCR a partir de genomas de DuCV identificados em amostras de tecidos de marrecos de Pequim.




## 3.2 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DUCV

Os resultados de detecção do genoma de DuCV em marrecos de Pequim mostraram que em 86 aves (89%), das 97 testadas, foi detectado o genoma viral, em ao menos um dos órgãos coletados (fígado, bursa de Fabricius e baço). Em 100% das aves amostradas das regiões de Brusque e Jaraguá do Sul, com 2 semanas e 8 semanas de idade, foi detectado o genoma de DuCV, enquanto que nas matrizes de Araquari, com 22 semanas, foi detectado o genoma viral em 21% das aves testadas (Tabela 2). Foram testadas um total de 291 amostras de tecidos, sendo 234 (80%) delas positivas para o DuCV. Com relação à quantificação viral em cada um dos seis grupos estudados, observou uma variação de $5{,}82 \times 10^{13}$ a $3{,}51 \times 10^{14}$ de cópias de DNA de DuCV/ml de amostra de baço, bursa de Fabricius e fígado. Matrizes de marrecos de Pequim apresentaram carga viral significativamente menor quando comparadas aos aviários integrados e abatedouros ($p<0{,}05$) (Tabela 3). Pode-se afirmar também que aviários integrados da região de Brusque com aves de 2 semanas tiveram carga viral menor que aviários integrados de Jaraguá do Sul e abatedouros ($p<0{,}05$). Não houve diferença significativa quanto à quantificação viral nos diferentes tecidos (Bursa de Fabricius, baço e fígado) ($p>0{,}05$) (Tabela 4).

Tabela 2- Frequência de detecção e quantificação do genoma de DuCV em marrecos de Pequim, no estado de Santa Catarina, provenientes de matrizeiros, aviários integrados e abatedouro.

| Grupos | Nº Aves Total | Nº aves com DuCV | Nº total de amostras coletadas (baço, bursa e fígado) | Nº Amostras positivas | Quantificação DuCV (cópias/ml) | Erro Padrão |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Matrizes** | **14** | **3** | **42** | **8** | **$5,82x10^{13}$** *a* | **$4,18x10^{13}$** |
| **Aviário 2sem[1]** | **6** | **6** | **18** | **10** | **$2,55x10^{14}$** *ab* | **$6,50x10^{13}$** |
| **Aviário 2sem[2]** | **9** | **9** | **27** | **25** | **$3,07x10^{14}$** *b* | **$5,14x10^{13}$** |
| **Abatedouro[3]** | **24** | **24** | **72** | **65** | **$3,08x10^{14}$** *b* | **$3,19x10^{13}$** |
| **Abatedouro[4]** | **21** | **21** | **63** | **60** | **$3,44x10^{14}$***b* | **$3,29x10^{13}$** |
| **Abatedouro[5]** | **23** | **23** | **69** | **66** | **$3,51x10^{14}$** *b* | **$3,19x10^{13}$** |
| **Total** | **97** | **86** | **291** | **234** | | |

[1]Aviário Integrado de Brusque
[2]Aviário Integrado de Jaraguá do Sul
[3]Aves abatidas do lote alojado em Brusque
[4]Aves abatidas do lote alojado em Jaragua do Sul
[5]Aves de Brusque e Jaragua do Sul com histórico de alta mortalidade e redução no ganho de peso

Tabela 3- Prevalência de DuCV nos três diferentes tecidos (fígado, baço e bursa de Fabricius) de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina

| Órgãos | Nº total de amostras (baço, bursa e fígado) | Nº Amostras com DuCV | Fígado | Órgãos Baço | Bursa de Fabrícius |
|---|---|---|---|---|---|
| **Matrizes** | **42** | **8** | **3** | **2** | **3** |
| **Aviário 2sem[1]** | **18** | **10** | **5** | **1** | **4** |
| **Aviário 2sem[2]** | **27** | **25** | **10** | **8** | **7** |
| **Abatedouro[3]** | **72** | **65** | **23** | **20** | **22** |
| **Abatedouro[4]** | **63** | **60** | **21** | **18** | **21** |
| **Abatedouro[5]** | **69** | **66** | **22** | **22** | **22** |
| **Total** | **291** | **234 (80%)** | **84** | **71** | **79** |

[1]Aviário Integrado de Brusque
[2]Aviário Integrado de Jaraguá do Sul
[3]Aves abatidas do lote alojado em Brusque
[4]Aves abatidas do lote alojado em Jaragua do Sul
[5]Aves de Brusque e Jaragua do Sul com histórico de alta mortalidade e redução no ganho de peso

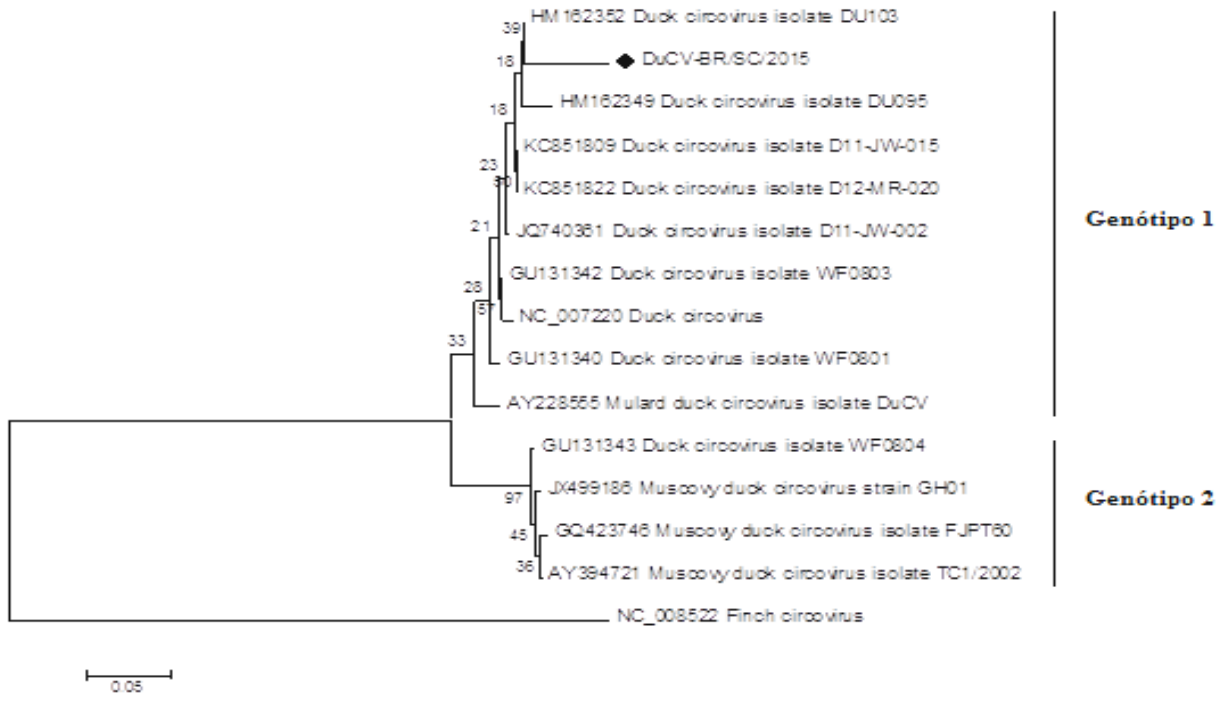
Tabela 4- Quantificação de DuCV nos diferentes tecidos de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina

| Órgãos | Total de Amostras Testadas | Quantificação de DuCV (cópias/ml) | Erro Padrão |
|---|---|---|---|
| **Fígado** | **97** | **$2{,}97x10^{14}$** *a* | **$3{,}10x10^{13}$** |
| **Baço** | **97** | **$2{,}46x10^{14}$** *a* | **$3{,}09x10^{13}$** |
| **Bursa de Fabricius** | **97** | **$2{,}73x10^{14}$** *a* | **$3{,}19x10^{13}$** |
| **Total** | **291** | | |

## 3.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA

As amostras amplificadas na qPCR para DuCV, de amostras de tecidos de diferentes marrecos de Pequim, após terem sido clonadas e sequenciadas foram submetidas a análise filogenética. A árvore filogenética (Figura 3) foi realizada usando o método Neighboring Joining mostrando os grupos de vírus isolados. As sequencias do presente trabalho agruparam com sequencias do genótipo 1. Assim, o genótipo de DuCV detectados nessas amostras é do tipo 1.

Figura 3- Árvore filogenética mostrando a relação da amostra DuCV tipo 1 detectada no Brasil/Santa Catarina (♦) com outras amostras depositadas no GenBank.




Fonte: Elaborada pela autora, 2016.

# 4 DISCUSSÃO

Embora a técnica da PCR convencional venha sendo utilizada para detecção de DuCV em patos e marrecos (LI et al., 2014; CHA et al., 2013; ZHANG et al., 2012; WAN et al., 2011a), alguns estudos relatam a maior sensibilidade da qPCR em relação a PCR convencional (WAN et al., 2011; FRINGUELLI et al., 2005). Infecções e co-infecções por DuCV tem sido comuns e reportadas em patos e marrecos sem nenhuma alteração clínica (WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2009). Nesse contexto, a possibilidade de quantificar a carga viral pela técnica de qPCR faz com que ela seja uma valiosa ferramenta no entendimento dos mecanismos de infecção de DuCV. Nesse estudo, a qPCR permitiu a detecção de genomas de DuCV com sensibilidade (até 100 moléculas/reação) e eficiência elevada (93%) (Figura 1). Além disso, a técnica mostrou ser altamente específica, não evidenciando picos inespecíficos na curva de Melting (Figura 2). Assim, a qPCR desenvolvida provou ser um instrumento adequado para a detecção e quantificação de DuCV.

Desde a primeira descrição de DuCV em patos da Alemanha (HATTERMANN et al., 2003), o vírus tem sido detectado em patos e marrecos de diversas localidades do mundo como Hungria, Taiwan, Estados Unidos, China, Coreia do Sul e Polônia (MATCZUK et al., 2015; CHA et al., 2014; CHA et al., 2013; WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2009; BANDA et al., 2007; CHEN et al., 2006; FRINGUELLI et al., 2005). Em algumas regiões, o DuCV é altamente prevalente como na Hungria (84%) (FRINGUELLI et al., 2005) e China (81,63%) (WAN et al., 2011; LIU et al., 2009; JIANG et al., 2009; ZHANG et al., 2009). O presente trabalho é o primeiro estudo a detectar DuCV em marrecos de Pequim no Brasil e, embora o estudo tenha sido realizado em apenas três regiões do estado de Santa Catarina (Araquari, Brusque e Jaraguá do Sul), pode-se inferir alta disseminação diante dos 84% (86/97) de positividade para DuCV dos marrecos de Pequim amostrados nessas regiões (Tabela 2) e de 80% (234/291) de positividade do total de amostras de tecidos analisadas (Tabela 3). Resultado esse semelhante ao encontrado nas regiões da Hungria e China.

Nesse contexto, é de suma importância reconhecer que DuCV está presente e altamente prevalente nas criações de marrecos de Santa Catarina, para que medidas de biosseguridade sejam incorporadas e melhorias no manejo de criação das aves sejam priorizadas. Fato esse que pode ser analisado quando se compara os resultados de quantificação do DNA de DuCV nos grupos estudados nesse trabalho. A quantificação viral em cada um dos seis grupos estudados mostrou uma variação de $5{,}82 \times 10^{13}$ a $3{,}51 \times 10^{14}$ de cópias de DNA de DuCV/ml nas amostra de baço, bursa de Fabricius e fígado. As amostras de tecidos dos marrecos entre 2 e 8 semanas de idade continham

aproximadamente, mais de $10^{14}$ cópias de DNA de DuCV/ml detectadas, enquanto as matrizes tiveram menor carga viral (Tabela 2). Semelhante a esse estudo, Fringuelli et al.2005, detectou mais de $10^{13}$ cópias de DNA de DuCV/ml em amostras de bursa de Fabricius de marrecos acima de 5 semanas em aviários da Hungria, porém eles não avaliaram matrizes.

A menor quantificação viral em matrizes parece estar aliada às melhores condições de biosseguridade quando comparados aos aviários integrados. Em matrizes, observa-se redução do fluxo de pessoas, maior tempo de criação das aves (75 semanas em média), melhor estrutura e manejo e também a separação de aves de diferentes idades dentro de um mesmo aviário. Na saída das aves, ocorrem lavagem e desinfecção total, com vazio sanitário de aproximadamente 30 dias, bem como a troca da cama de aviário. Em aviários integrados, o controle do fluxo de pessoas não é rigoroso, sendo observada entrada constante de pessoas que não estavam ligadas ao processo de produção. Pode-se enfatizar também o período curto de 8 semanas de produção, com saída das aves sem a troca total da cama e vazio sanitário de 10 dias em média, bem como a mistura de aves de diferentes idades nos aviários.

Com relação a possível via de transmissão do DuCV, pode-se sugerir pela baixa detecção e carga viral em marrecos de matrizeiros, que as aves podem ter se infectado nos aviários integrados no decorrer da criação e assim permanecerem até o momento do abate. Embora os dados não tenham sido estatisticamente diferentes, observa-se uma tendência de aumento da carga viral nas aves de abatedouros (8 semanas) comparadas as de aviários integrados (2 semanas). Esse dado pode sugerir a resistência do vírus em se manter no ambiente e se multiplicar no decorrer do processo de produção ou, ainda, a possível susceptibilidade das aves mais velhas, já que estudos relatam que patos e marrecos acima de 4 semanas são mais sensíveis ao DuCV (WAN et al., 2011; ZHANG et al., 2009) e também demonstraram cargas virais mais elevadas (FRINGUELLI et al., 2005).

As amostras de tecidos (baço, bursa e fígado) analisadas, em sua maioria, foram provenientes de marrecos clinicamente saudáveis, com exceção do grupo de marrecos abatidos com histórico de alta mortalidade nas primeiras semanas e redução no ganho de peso. A manifestação subclínica é sugerida como a forma mais comum de infecção pelos circovírus, porém doenças concomitantes foram documentadas como consequência do comprometimento da resposta imune causada pelo DuCV (WAN et al., 2011; BANDA et al., 2007; FRINGUELLI et al., 2005). Autores detectaram o DuCV em 21,8% (32/147) das amostras de bursa de Fabricius e fígado de marrecos de Pequim sem sinais clínicos na Coréia do Sul (CHA et al., 2014). Outro estudo indicou que a maioria dos marrecos positivos para DuCV não exibiam anormalidades clínicas aparentes (WAN et al., 2011), sendo o mesmo observado nesse trabalho.

Em contrapartida, sabe-se que DuCV pode predispor ao acometimento por outras doenças, como vírus da hepatite dos patos (DHV), Salmonelas, *Riemerella antipestifer*, *Pasteurella multocida* e *Staphilococcus aureus* (CHA et al., 2014; ZHANG et al., 2009; BANDA et al., 2007; SOIKE et al., 2004). FRINGUELLI et al. (2005) isolou diversos agentes concomitantes com DuCV em marrecos de Pequim da Hungria, como enterites, pasteureloses, colibaciloses, streptococosis, pneumonias e pericardites. DuCV já foi detectado em patos com desordens de crescimento, pobre condição corporal e baixo peso na China (ZHANG et al., 2012). Nos Estados Unidos, marrecos de Pequim positivos para DuCV apresentaram baixo desenvolvimento corporal, deformidades de pernas e artrites (BANDA et al., 2007).

Interessante destacar que, mesmo não havendo diferença estatística entre a carga viral do grupo de marrecos com histórico de alta mortalidade e redução de ganho de peso e os demais grupos, os dados absolutos sugerem maior quantificação viral em tecidos de marrecos com esse histórico (Tabela 2). Assim, embora não se possa afirmar que o aumento de mortalidade e o baixo ganho de peso estejam relacionados à infecção por DuCV, ou seja, não se pode afirmar uma correlação entre altas cargas do vírus e efeitos clínicos nesses marrecos, estes animais apresentaram uma quantificação viral numericamente mais alta que os demais grupos. Também, ao estabelecer mudanças na estrutura desses aviários, limpeza e desinfecção total dos mesmos, seguidos da total troca de cama e sistema *all in all out* (todos dentro todos fora), o quadro de alta mortalidade e baixo ganho de peso foi revertido nos lotes alojados posteriormente.

Conforme mencionado, DuCV está relacionado a formas subclínicas, mas também facilita infecções concomitantes, logo, nas aves com histórico, também podemos supor que outro agente pode estar presente causando efeitos clínicos, debilitando as aves, e nesse estado mais frágil do animal, o DuCV pode se replicar mais facilmente. Vale salientar que, conforme os resultados, os lotes alojados posteriormente nos mesmos aviários também foram positivos para DuCV, porém não apresentaram mortalidades nas primeiras semanas ou qualquer outra alteração clínica. Os fatores que interferem no curso e resultado da infecção são desconhecidos, porém alguns autores têm sugerido a presença de outros patógenos como potenciais interferências na infecção (WOODS e LATIMER, 2008; MCNULTY e TODD, 2008; FRINGUELLI et al., 2005; SOIKE et al., 2004). Assim, tais observações nos permitem sugerir que a melhora na estrutura dos aviários e manejo das aves contribuiu para que os prejuízos de produção e/ou o potencial imunossupressor do DuCV tenham sido amenizados.

Com relação à detecção e quantificação viral nos diferentes órgãos analisados, não houve diferença estatística significativa (Tabela 4), sugerindo que é possível detectar DuCV em bursa de

Fabricius, baço e fígado de marrecos de Pequim. Não existem relatos que comparem a carga viral nos diferentes tecidos de patos e marrecos, entretanto, através das técnicas de PCR e qPCR, os autores têm detectado o DuCV nos mesmos tecidos utilizados no presente estudo, sugerindo esses como tecidos de eleição para diagnóstico do vírus (CHA et al., 2013; WAN et al., 2011; ZHANG et al., 2012; WANG et al., 2011; FRINGUELLI et al., 2005; HATTERMANN et al., 2003).

Até o momento, dois genótipos DuCV: *DuCV1* e *DuCV2* foram identificados com base nas análises do gene do capsídeo e das sequência genômicas de amostras de tecidos de marrecos de Pequim de diferentes regiões da China entre os anos de 2008 e 2010 (ZHANG et al., 2013). Outros autores demonstraram que DuCV pode ser dividido em 2 grupos: grupo 1 (linhagem Euro-USA) e grupo 2 (linhagem Taiwan), com aproximadamente 10% de diferenças genômicas entre os dois tipos. Eles sugerem que não há diferenças óbvias entre as estirpes de DuCV isolados a partir de diferentes localizações geográficas ou de espécies diferentes de patos e marrecos (WAN et al., 2011). As amostras positivas sequenciadas no presente estudo foram caracterizadas como genótipo tipo 1, baseado em comparações com amostras depositadas no GenBank (Figura 3). O genótipo tipo 1 foi prevalente em estudos realizados com amostras positivas de DuCV na Coreia do Sul (CHA et al., 2013) entre os anos de 2011 e 2012, na região da China entre os anos de 2008 e 2010 (WANG et al., 2011) e na Polônia em 2015 (MATCZUK et al., 2015) . Observa-se, portanto, que o genótipo tipo 1 do DuCV tem sido prevalente nas regiões acima citadas, e que o mesmo genótipo também possa estar prevalente no estado de Santa Catarina.

O presente trabalho serve de alerta para as autoridades e médicos veterinários de que o vírus está presente no estado de Santa Catarina e poderá acarretar perdas econômicas nas criações, frente às consequências de seu potencial imunossupressor, principalmente devido às infecções concomitantes. Mais estudos devem ser realizados para melhor elucidar os aspectos epidemiológicos e patogênicos do DuCV.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDA, A.; GALLOWAY-HASKINS, RI.; SANDHU, TS.; SCHAT, KA. **Genetic analysis of a duck circovirus detected in commercial pekin ducks in New York**. Avian Dis.51:90–5, 2007.

CHA S. Y.; KANG M.; YOON R. H. **Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates in Pekin ducks from South Korea.** Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 36: 473- 479, 2013.

CHA S.Y.; SONG. **Prevalence of duck circovirus infection of subclinical pekin ducks in South Korea**. J Vet Med Sci. ;76:597–99, 2014.

CHEN C. L., WANG P. X., LEE M. S., SHIEN J. H., SHIEH H. K., OU S. J., CHEN C. H., CHANG P. C. **Development of a polymerase chain reaction procedure for detection and differentiation of duck and goose circovirus**. *Avian Dis.* 50: 92–95, 2006.

FRINGUELLI E., SCOTT A., BECKETT A., MCKILLEN J., SMYTH J., PALYA V., GLAVITS R., IVANICS E., MANKERTZ A., FRANCIOSINI M. **Diagnosis of duck circovirus infections by conventional and real-time polymerase chain reaction tests.** *Avian Pathol.* 34: 495–500, 2005.

FU G, SHI S, HUANG Y, CHENG L, PENG C, WAN C. **Genetic diversity and genotype analysis of duck circovirus.** Avian Dis. 55:311–18, 2011.

HATTERMANN K, SCHMITT, C.;, SOIKE, D.; MANKERTZ, A. **Cloning and sequencing of Duck circovirus (DuCV)**. Arch Virol. 2003;148:2471–80, 2003.

JIANG, S., ZHANG, X. LIU, S., WANG, Y. **PCR detection and sequence analysis of duck circovirus in sick Muscovy ducks**. Virology. Sin. 23, 265-271, 2009.

KIMURA M. **A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences.** Journal of Molecular Evolution. 16:111-120, 1980.

LI, Z.; WANG, X.; ZHANG. **Evidence of possible vertical transmission of duck circovirus**. Veterinary Microbiology, 174:229-232, 2014.

LIU, S.N., X. X. ZHANG, J. F. ZOU, Z. J. XIE, Y. L. ZHU, Q. ZHAO, E. **Developemnt of an indirect ELISA for the detection of duck circovirus infection in duck flocks.** Vet. Microbiology. 145:41-46, 2010.

MATCZUK, A.C., KRAWIEC, M. **A new duck circovirus sequence, detected in velvet scoter (*Melanitta fusca*) supports great diversity among thius species of virus**. Virology Journal, 12:121, 2015.

MCNULTY, M.S. AND TODD, D. **Chicken anemia virus. In: A Laboratory Manual for the Isolation, Identification and Characterization of Avian Pathogens**. 5th ed L.D. Zavala, D.E. Swayne, J.R. Glission, J.E. Pearson, W.M. Reed, M.W. Jackwood and P.R. Woolcock. Omni Press Inc., Madison, Wisconsin. 124-127, 2008.

PHEIX KV, WESTON JH, YPELAAR I, LAVAZZA A, SMYTH JA, TODD D, WILCOX GE, RIDAL SR. **Nucleotide sequence analysis of a novel circvirus of canaries and its relationship to other members of the genus Circovirus of the family Circoviridae.** J Gen Virol. 82:2805–2809, 2009.

RIJSEWIJK, F.A.M. **Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus**. Archive Virology, v. 156, p. 1097-1100, 2011.

RITCHIE BW, NIAGRO FD, LUKERT PD, STEFFENS WL, LATIMER KS. **Characterization of a new virus from cockatoos with psittacine beak and feather disease.** Virology. 1989;171:83–8, 1989.

ROSENBERGER, J.K., CLOUD, S.S. **Chicken anemia virus**. Poult. Sci. 77, 1190-1192, 1998.

SAITOU N. E NEI M. **The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees**. Molecular Biology and Evolution 4:406-425, 1987.

SAMBROOK. J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SOIKE D., ALBRECHT K., HATTERMANN K., SCHMITT C., MANKERTZ A. **Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders**. Vet. Rec. 154: 792–793, 2004.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, KUMAR S. **MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods.** Mol Biol Evol. 2011;28:2731–39, 2005.

TEIXEIRA, T.F. ET AL. **Torque teno sus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome.** Virus Genes , v.47, p.276–281, 2013.

TODD, D.; WESTON, JH.; SOIKE, D.; SMYTH, JA. **Genome sequence determinations and analyses of novel circoviruses from goose and pigeon**. Virology;286:354–362, 2001.

TODD, D.. **Circoviruses: Immunosuppressive threats to avian species: A review**, Avian Pathology, 29:5, 373-394, 2000.

WAN ET AL., WAN C. H., FU G. H., SHI S. H., CHENG L. F., CHEN H. M., PENG C. X., HUANG Y. **Epidemiological investigation and genome analysis of duck circovirus in Southern China**. *Virol. Sin.* 26: 289–296, 2011.

WAN ET AL. **The development of a rapidSYBR green I-based quantitative PCR for detection of duck circovirus.** Virology Journal. 8, 465, 2011a.

WANG D, XIE X, ZHANG D, MA G, WANG X, ZHANG D. **Detection of duck circovirus in China: A proposal on genotype classification.** Vet Microbiol. 147:410–415, 2011.

WOODS IW, LATIMER KS. **Circovirus infection of pigeons and other avian species** In: Saif YM, Barnes HJ, Glisson JR, Fadly AM, McDougald LR, Dwayne DE, editors. Diseases of Poultry. 11th edn. Iowa State Press. p. 202–211, 2008.

ZHANG , X. **An investigation of duck circovirus and co-infection in Cherry Valley ducks in Shandong Province, China.** Vet. Microbiol. 133:252–256, 2009.

ZHANG, Z.; JIA, R.; LU, Y..; WANG, M. **Identificacion, genotyping, and molecular evolution analysis of duck circovirus**. Gene 529: 288-295, 2013.

ZHANG, X. JIANG, S., WU, J., ZHAO, Q., SUN, Y. KONG, Y., LI, X., YAO, M., CHAI, T. **An investigation of duck circovirus and co-infection in Cherry Valley ducks in Shandong Province, China.** Vet. Microbiology. 133,252-256, 2009.

ZHANG, X.X., LIU, S.N., XIE, Z.J., KONG, Y.B., JIANG, S.J. **Complete genome sequence analysus of duck circovirus strains from Cherry Valley duck**. Virol. Si. 27, 154-164, 2012.

## 3 CONCLUSÕES

- O vírus CAV e AGV2 não estão presentes nas criações de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina.
- O vírus DuCV está presente em tecidos de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina.
- Com base na menor carga viral encontrada em aviários matrizes de marrecos de Pequim, pode-se concluir que o manejo adequado e a adoção de práticas de biosseguridade nesses aviários influenciam na quantificação de DuCV.
- Baço, bursa de Fabricius e fígado são tecidos de eleição para o diagnóstico de DuCV em marrecos de Pequim.
- Estima-se uma carga viral aproximadamente superior a $10^{14}$ cópias de DNA de DuCV/ml em amostras de baço, bursa de Fabricius e fígado em marrecos de Pequim entre 2 e 8 semanas de idade nas regiões de Brusque e Jaraguá do Sul/SC.
- Com base no sequenciamento e caracterização molecular das amostras de tecidos de marrecos de Pequim pode-se concluir que o genótipo presente nas amostras no estado de Santa Catarina é do tipo 1.

## 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo não detectou CAV e AGV2 nas criações de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina, em contrapartida a alta prevalência de DuCV reportada é preocupante frente às perspectivas de crescimento das produções na região. Assim como nas criações de galinhas, em resposta a alta demanda de mercado, a intensificação dos processos de produção abriu portas para diversos agentes imunossupressores causadores de prejuízos na indústria (como o *vírus da anemia infecciosa das galinhas- CAV*), o vírus DuCV também poderá ser causador de grandes perdas na produção de patos e marrecos.

Os resultados de detecção de DuCV em criações de marrecos de Pequim no estado de Santa Catarina sugerem que a adoção de medidas de biosseguridade e o correto manejo nos aviários podem contribuir para a redução dos impactos do vírus, principalmente quanto ao aspecto imunossupressor, que fragiliza as aves propiciando co-infecções. Assim, faz-se necessário maior rigor quanto à adoção de medidas de biosseguridade e melhorias constantes no manejo de criações marrecos de Pequim. Em resumo, as criações de marrecos necessitam de atenção sanitária assim como é dada às criações de galinhas na região catarinense, pois, além de albergarem vírus que comprometem os resultados das indústrias de patos e marrecos da região, podem ser reservatórios para outros agentes de importância na avicultura.

Esse estudo foi o primeiro a reportar DuCV no Brasil, porém é patente reconhecer a escassez de pesquisas sanitárias em marrecos de Pequim. Por isso, faz-se necessário a continuidade desse estudo visando a melhor compreensão da patogenia e dos aspectos epidemiológicos de DuCV, bem como estudos sobre sanidade de marrecos de uma maneira geral. Desta forma, programas de prevenção e controle de agentes poderão ser elaborados com critérios e embasamentos científicos nas produções.