

**FLAVIA HARUMI SCHEFFER YAMAKAWA**

**DETECÇÃO DE CIRCOVÍRUS E ANÁLISE FILOGENÉTICA  
DE AGV2 EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Ubirajara Maciel da Costa  
Coorientador: Paulo Augusto Esteves

**LAGES, SC  
2015**

Yamakawa, Flavia Harumi Scheffer  
Detecção de Circovírus e análise filogenética de  
AGV2 em frangos de corte /Flavia Harumi Scheffer  
Yamakawa - Lages, 2015.  
60 p.: il.; 21 cm

Orientador: Ubirajara Maciel da Costa  
Coorientador: Paulo Augusto Esteves  
Inclui bibliografia.

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado  
de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal, Lages, 2015.

1.Vírus da Anemia das Galinhas. 2.Girovírus  
Aviário tipo 2. 3. Detecção molecular.I. Yamakawa,  
Flavia Harumi Scheffer. II. Costa, Ubirajara  
Maciel da. III. Universidade do Estado de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

**FLAVIA HARUMI SCHEFFER YAMAKAWA**

**DETECÇÃO DE CIRCOVIRUS E ANÁLISE FILOGENÉTICA  
DE AGV2 EM FRANGOS DE CORTE**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina.

**Banca Examinadora:**

Orientador:

---

Prof. Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membro:

---

Prof. Dr. Álvaro Menin  
Universidade Federal do Estado de Santa Catarina - UFSC

Membro:

---

Prof. Dr. Gustavo Silva  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Lages, 14/08/2015.



“O que prevemos raramente ocorre; o que menos esperamos geralmente acontece.”

George Bernard Shaw



## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Maria Augusta e Auro, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos e em todas as escolhas durante a graduação e quando iniciei o mestrado.

Ao Dr. Ubirajara por ter me orientado, não somente no mestrado, mas em vários anos na graduação, e ao Dr. Paulo Esteves por ter aceito ser meu coorientador, pelos conhecimentos repassados, pela paciência, pelo tempo dedicado. Às professoras Dr<sup>a</sup> Eliana Vaz e Dr<sup>a</sup> Sandra Ferraz e demais professores do mestrado pelos ensinamentos.

À EMBRAPA Suínos e Aves, pelo apoio e oportunidade da realização do projeto, sem esquecer da Tânia Klein e Germana, que foram mais do que essenciais para que tudo fosse possível, e que no final, mesmo que após muitas quedas, tudo da certo.

Agradeço ao Obiratã e ao Mercolab/Garibaldi-RS pela disponibilidade de realizarmos a primeira etapas de coletas.

Às amigas de laboratório Cláudia Duarte, Caroline Martini, Paula Wildemann, Fernanda Melo, Mônica Urió, não só por compartilhar seus conhecimentos, mas também por tornar os longos dias de trabalho mais alegres, forrados de café. Aos bolsistas e estagiários que passaram pelo CEDIMA neste período, Raquel Alves, Igor, Fernanda Boldo, Marina's, Alice, Ialanna, e também a todo pessoal da bacteriologia, por toda ajuda e bons momentos.

Às companheiras de viagem, Cláudia Pies, Leíse Parizotto e Cláudia Duarte, que tornavam as longas idas e vindas até o RS muito menos cansativas, sempre com muito bom humor e chimarrão.

Ao CAV/UDESC pela oportunidade de realizar o mestrado e a CAPES/FAPESC pela concessão de bolsa.



## RESUMO

YAMAKAWA, Flavia H. S. **Detecção de Circovírus e análise filogenética de AGV2 em frangos de corte.** 2015. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Sanidade Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

O vírus da anemia das galinhas (CAV) é um importante vírus pertencente a família *Circoviridae*, gênero *Girovirus*, conhecido por levar a perdas significativas na avicultura, este vírus pode causar imunossupressão e doença principalmente em aves jovens. O CAV era o único vírus desta família conhecido por infectar galinhas até 2011, após a descoberta de um novo vírus, o Girovírus Aviário tipo 2 (AGV2). Segundo consta na literatura, o AGV2 está estreitamente relacionado ao CAV, além de estar amplamente distribuído em frangos no Brasil e em outros países, mas seu potencial patogênico ainda é desconhecido e trabalhos sobre sua epidemiologia molecular ainda são bastante escassos. Assim, o presente trabalho teve por objetivo realizar a detecção de CAV (*Nested-PCR*), e AGV2 (PCR) em amostras de DNA extraídas de tecido do timo, de aves alojadas em plantéis de frango de corte de dois estados da região Sul do Brasil. Além disso, realizar a análise filogenética de amostras positivas para AGV2. Os resultados apontaram que das 180 aves testadas 105 (58,33%) foram positivas para CAV e 39 (21,67%) positivas para AGV2. Do material positivo para AGV2 foram selecionados onze *amplicons* para sequenciamento e análise filogenética, onde foi possível evidenciar que não houve diferenças entre o material analisado. As sequências obtidas foram comparadas com amostras provenientes de outros países, muitas destas detectadas em humanos (HGYV), não tendo sido possível, no presente trabalho, observar correlação entre distribuição

geográfica e variabilidade genética entre a maioria das amostras de AGV2 ora estudadas.

**Palavras-chave:** Vírus da Anemia das Galinhas. Girovírus Aviário tipo2. Detecção molecular.

## ABSTRACT

YAMAKAWA, Flavia H. S. **Circovirus detection and AGV2 phylogenetic analysis in broiler chicken.** 2015. 60p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal – Área: Sanidade Animal) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2015.

Chicken anemia virus (CAV) is an important virus that belongs to Circoviridae family, Gyrovirus genre, known to lead to significant losses in poultry, the viruses can cause immunosuppression and disease especially in young birds. CAV was the only virus of this family known to infect chickens by 2011, after the discovery of a new virus, the Avian Gyrovirus type 2 (AGV2). According to the literature, AGV2 is closely related to CAV, as well as being widely distributed in chickens in Brazil and other countries, but its pathogenic potential is unknown and studies on molecular epidemiology are still scarce. The present study aimed to detect CAV (Nested-PCR), and AGV2 (PCR) on DNA extracted from samples of thymus tissue of broiler chickens housed on two states of southern Brazil. In addition, perform phylogenetic analysis of AGV2 positive samples. Results showed that of 180 birds tested, 105 (58.33%) were positive for CAV and 39 (21.67%) positive for AGV2. On the positive material for AGV2 were selected eleven amplicons for sequencing and phylogenetic analysis, where it became clear that there were no differences among the samples. The sequences obtained were compared with samples from other countries, many of these detected in humans (HGyV). It was not possible in the present work, observe correlation between geographical distribution and genetic variability among most samples AGV2 now studied.

**Keywords:** Chicken Anemia Virus. Avian Gyrovirus type 2. Molecular detection.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

- Figura 1-** Representação esquemática da estrutura tridimensional do CAV, apresentando o capsídeo formado por 12 unidades pentaméricas em forma de trompete.....24
- Figura 2-** Organização do genoma de CAV, com um único transcrito, que contém três ORFs com sobreposição parcial, que codificam as três proteínas virais (VP1, VP2 e VP3) e uma região não transcrita que compreende a região promotora.....25
- Figura 3-** Comparação da estrutura genômica, em forma linear, do Girovírus Aviário tipo 2 (AGV2) com o Vírus da Anemia das Galinhas (CAV).....30
- Figura 4-** Mapa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.....33
- Gráfico 1-** Demonstração do número de animais positivos obtidos por *Nested*-PCR para pesquisa do CAV nos estados RS e SC.....39
- Figura 5-** Resultados parciais obtidos para a PCR realizada para CAV utilizando os primers externos VP1/VP3, e amplificação de um fragmento de 713 pb, nem sempre possível de ser visualizada.....41
- Figura 6-** Resultados parciais obtidos para a Nested-PCR realizada para CAV, utilizando os primers internos N3/N4 com amplificação de um fragmento de 210 pb.....41
- Gráfico 2-** Demonstração do número de animais positivos obtidos por PCR para pesquisa do AGV2 nos estados RS e SC.....42
- Figura 7-** Resultado parciais obtidos para a PCR realizada para AGV2, utilizando os primers AGVF/AGVR com amplificação de um fragmento de 345 pb....43

<b>Figura 8-</b>	Comparação da sequência de aminoácidos de VP2 de AGV2 obtidas durante o experimento.....	45
<b>Figura 9-</b>	Análise filogenética das sequências de nucleotídeos de AGV2 avaliadas.....	47

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1-</b>	Sequência dos iniciadores utilizados neste estudo para a detecção de AGV2 e CAV.....	36
<b>Tabela 2-</b>	Resultados obtidos para pesquisa de CAV em granjas do RS (A,B,C) e SC (D,E,F).....	40
<b>Tabela 3-</b>	Resultados obtidos para pesquisa de AGV2 em granjas do RS (A,B,C) e SC (D,E,F).....	43



## LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

Ton	Tonelada
CAV	<i>Chicken Anemia Virus/</i> Vírus da Anemia das Galinhas
AGV2	<i>Avian Gyrovirus type 2/</i> Girovírus aviário tipo 2
Nm	Nanômetros
%	Porcentagem
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid/</i> Ácido desoxirribonucleico
ORFs	<i>Open Reading Frames</i>
VP	<i>Viral Protein/</i> Proteína viral
kDa	QuiloDalton
DR	<i>Direct Repeat</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid/</i> Ácido ribonucleico
Kb	Quilobase
SPF	<i>Specific Pathogen Free</i>
RS	Rio Grande do Sul
SC	Santa Catarina
CEDIMA	Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
SNC	Sistema Nervoso Central
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
ng	Nanograma
µL	Microlitro
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
mM	Milimolar
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
ρM	Picomolar
°C	Grau Celsius
pb	Pares de base
U	Unidade

TBE	Tris Borato EDTA
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra- Acético
UV	Ultravioleta
NCBI	<i>National Center of Biotechnology Information</i>
HGyV	<i>Human Gyrovirus</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
2.1	VÍRUS DA ANEMIA DAS GALINHAS (CAV).....	23
2.1.1	Anemia infecciosa das galinhas.....	27
2.1.2	Medidas de controle.....	29
2.1.3	Diagnóstico de CAV.....	29
2.2	GIROVÍRUS AVIÁRIO TIPO 2 (AGV2).....	30
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
3.1	COLETA DE MATERIAL.....	33
3.2	EXTRAÇÃO DE DNA.....	34
3.3	DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DO DNA.....	35
3.4	CONDIÇÕES DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE AGV2.....	35
3.5	CONDIÇÕES DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E <i>Nested</i> -PCR PARA DETECÇÃO DE CAV.....	36
3.6	ANALISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	37
3.7	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	37
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
4.1	AMPLIFICAÇÃO DE CAV.....	39
4.2	AMPLIFICAÇÃO DE AGV2.....	42
4.3	SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA.....	44
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>54</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A produção avícola é muito importante para o mercado brasileiro, sendo geradora de divisas sociais e econômicas pelo seu impacto positivo na balança comercial do país (SHARMA, 2015), oferecendo mais que 3 milhões de empregos diretos e indiretos (UBABEF, 2012).

Atualmente o Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango, ficando atrás somente dos Estados Unidos e da China, no entanto é o maior exportador mundial, desde 2004, totalizando 3.918 mil/ton de carne exportada anualmente, principalmente para países do Oriente Médio e Ásia(UBABEF, 2014).

No Brasil as principais empresas do setor trabalham em sistemas de integração, o que facilita a logística de produção e diminuição de gastos com transporte. Dessa forma as granjas integradas tendem a se concentrar em determinadas regiões, ocasionando um aumento da população de aves no local. Esta intensificação da avicultura associada a condições ambientais e práticas de manejo estressantes, pode resultar na ocorrência de infecções por agentes microbianos e no aparecimento de casos de imunossupressão.

Dentre as doenças de importância para a avicultura de produção, as imunossupressoras merecem destaque, uma vez que estão associadas a queda no desempenho das aves, falhas de resposta vacinal, predisposição à infecção por agentes secundários, aumento dos custos de produção e geração de produto com baixo valor econômico. Uma das principais causas infecciosas relacionadas à imunossupressão em frangos é a infecção pelo Vírus da anemia das galinhas (*Chicken Anemia Virus - CAV*) membro da família *Circoviridae*, gênero *Gyrovirus*(TODD, 2000).

Outro vírus pertencente ao gênero *Gyrovirus*, o Girovírus Aviário Tipo 2 (*Avian Gyrovirus Type 2 - AGV2*), foi descrito pela primeira vez no Brasil, em amostras de soro de

frangos comerciais apresentando perda de peso e apatia (RIJSEWIJK *et al.*, 2011). Contudo, como seu potencial patogênico ainda é desconhecido, estudos estão sendo realizados para determinar o efeito da infecção deste agente em aves.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 VÍRUS DA ANEMIA DAS GALINHAS

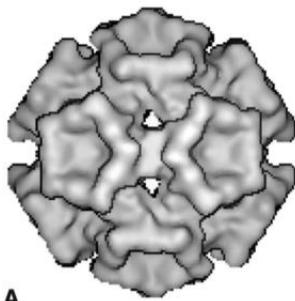
O Vírus da Anemia das Galinhas (CAV), foi descrito pela primeira vez em 1979, por Yuasa *et al.*, como um novo agente viral causador de doença em aves jovens. O maior avanço relacionado à doença ocorreu em 1983, pelo mesmo grupo de pesquisadores, quando reportaram que o vírus possuía a característica de citopatogenicidade em linhagens de células linfoblastoides de galinhas, derivadas do tumor de doença de Marek, chamadas de MDCC-MSB1. Essa descoberta permitiu o desenvolvimento de ensaios *in vitro*, como o uso da técnica de vírus neutralização, detecção de anticorpos anti-CAV (YUASA; IMAI; TEZUCA, 1985) e a purificação do vírus a partir do sobrenadante dos cultivos infectados (GORYO *et al.*, 1987). Desde sua primeira descrição, o vírus tem sido isolado em todos os países que possuem avicultura comercial (SCHAT e van SANTEN, 2008).

No Brasil, o vírus foi isolado pela primeira vez em aves de granjas comerciais de corte, nos estados de Santa Catarina e São Paulo, com sinais clínicos de anemia, atrofia de timo, aplasia de medula óssea e baixo rendimento e ganho de peso, sinais compatíveis aos de infecção por CAV (BRENTANO *et al.*, 1991).

Pertencente à família *Circoviridae*, gênero *Girovirus*, trata-se de um vírus sem envelope, de formato icosaédrico e média de diâmetro de 25 a 26,5 nm, sendo considerados como um dos menores vírus animais. O capsídeo apresenta uma superfície com aspecto diferenciado quando comparado aos demais membros da família, formado por uma estrutura icosaédrica contendo 60 moléculas de proteína do capsídeo arranjadas em 12 unidades pentaméricas, e seus capsômeros possuem aparência pontiaguda em forma de trompete (Figura 1) (CROWTHER *et al.*, 2003).

Por ser um vírus não envelopado, CAV é extremamente resistente no ambiente, é resistente ao clorofórmio, pH ácido por tempo prolongado, tratamento com calor em altas temperaturas e desinfetantes comerciais não são eficazes; pode ser inativado por fenol 50% por 5 minutos, iodo ou hipoclorito 10% por 2 horas (YUASA; TANIGUCHI; YOSHIDA , 1979; YUASA, 1992).

**Figura 1** - Representação esquemática da estrutura tridimensional do CAV, apresentando o capsídeo formado por 12 unidades pentaméricas em forma de trompete.



Fonte: Crowther et al., 2003

O genoma de CAV possui aproximadamente 2.3 kb de fita simples, circular e polaridade negativa, ou seja, as sequências codificadoras estão no DNA complementar. Este DNA complementar é formado por três *Open Reading Frames* (ORFs) que se sobrepõem parcialmente, e codificam as proteínas virais VP1 (51.6 kDa), VP2 (24 kDa) e VP3 (13.6 kDa); o genoma também contém uma região 5' não transcrita com atividade promotorae um sinal de poliadenilação(Figura 2)(NIAGRO, 1998, apud SCHAT e van SANTEN, 2008; NOTEBORNet al., 1994).

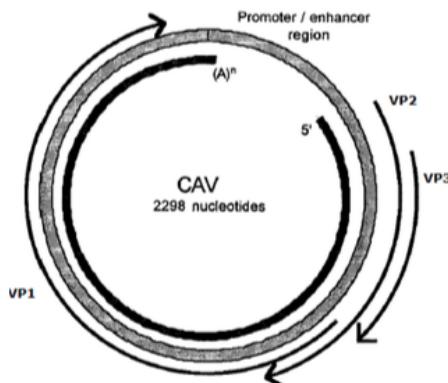
A VP1, codificada pela ORF1, é a proteína estrutural encontrada no capsídeo. Possui uma região semelhante à histonas, sugerindo o local no qual o DNA se liga dentro do

cápsideo viral (MEEHAM, 1992, apud SCHAT e van SANTEN, 2008).

A VP2, é uma proteína não estrutural com papel multifuncional codificada pela ORF2, atua como modelo estrutural (*scaffolding*) para a VP1(NOTEBORN e KOCH, 1995), tem atividade fosfatase de serina/treonina e tirosina e,também, participa na indução da apoptose celular (NOTEBORN, 2004).

A proteína não estrutural VP3, também chamada apoptina, é codificada pela ORF3, tratando-se de um fator indutor de apoptose em células do timo, o que resulta na depleção de linfoblastos e linfócitos T e consequente imunodepressão (NOTEBORN *et al*, 1994).

**Figura 2** - Organização do genoma de CAV, com um único transcrito, que contém três ORFs com sobreposição parcial, que codificam as três proteínas virais (VP1, VP2 e VP3) e uma região não transcrita que compreende a região promotora.



Fonte: Adaptado de Todd, 2000.

O genoma de CAV contém uma região promotora evidente, reguladora de sua transcrição. Os principais componentes desta região são quatro ou cinco (dependendo da

amostra viral) *direct repeats* (DRs) de 21 pb, que são interrompidas por uma inserção de 12 bases entre o segundo e o terceiro DR. Tais DRs são sequências de nucleotídeos que estão presentes em múltiplas cópias no genoma. Para que haja uma transcrição ótima do CAV, é necessária a presença de todas as DRs além da inserção de 12 pb. Estudos demonstram que alterações na região de inserção de 12 pb são capazes de diminuir o efeito citopático de CAV em linfócitos T. Já a presença de uma repetição extra de DR, aumenta a atividade transcrecional, enquanto uma deleção nos dois primeiros DR pode reduzir em até 50% sua atividade (KOCH *et al.*, 1995; NOTEBORN *et al.*, 1998).

Com relação à replicação viral, os vírions de CAV penetram na célula por mecanismos de adsorção e penetração convencionais (NOTEBORN *et al.*, 1992; PHENIX *et al.*, 1994). Devido a sua simplicidade genômica e estrutural, se torna necessária a participação de várias proteínas das células hospedeiras, além de ocorrer durante a fase S do ciclo celular (FLORES, 2007). A replicação ocorre no núcleo da célula hospedeira, pelo mecanismo de círculo rolante, e envolve a síntese de uma molécula de DNA fita dupla (replicativo intermediário). Após a sua síntese, o DNA replicativo intermediário é transcrito a um mRNA de 2.1 kb. Este mRNA é policistrônico e contém as três ORFs, que irão dar origem às proteínas virais (TODD *et al.*, 1996).

A partir do DNA replicativo intermediário, também são produzidas moléculas de DNA de fita simples circulares, correspondentes ao DNA genômico. Estas moléculas são encapsuladas por múltiplas cópias da proteína VP1, formando novas partículas virais infecciosas, responsáveis pela disseminação do agente (FLORES, 2007).

### 2.1.1 Anemia infecciosa das galinhas

A galinha é o único hospedeiro conhecido para CAV, e a doença causada por ele leva a perdas significativas, principalmente em frangos de corte. Apesar da enfermidade ser mais frequente em pintinhos jovens, que se infectam de forma vertical a partir de matrizes com a infecção subclínica, aves de todas as idades são suscetíveis à infecção por CAV (YUASA; TANIGUCHI; YOSHIDA, 1979). A transmissão vertical, da matriz para o embrião, é a forma mais comum, embora possa haver transmissão horizontal via fecal-oral, devido à presença de alta concentração do vírus nas fezes de aves com 2 a 5 semanas pós infecção (HOOP, 1992). Assim, o vírus excretado nas fezes pode contaminar a cama e instalações, podendo persistir no ambiente devido à sua alta resistência à inativação. As taxas de morbidade, mortalidade e a severidade da doença variam de acordo com o título do vírus, via de infecção, idade das aves, imunidade passiva e amostras de maior patogenicidade (FLORES, 2007).

O único sinal clínico específico de CAV é a anemia, com hematócrito baixo, variando de 6 a 20% (normal 27 a 35%) (GORYO et al., 1985). Este sinal é consequência da pancitopenia, pela infecção de hemocitoblastos nos dias 3 e 4 pós inoculação viral, resultando em diminuição de eritrócitos, células brancas e trombócitos. O efeito imunossupressor se deve à destruição de células T, granulócitos e progenitores de macrófagos, além de efeitos adversos causados na função de algumas células, como a perda de células *natural killer* e alterações em mediadores como citocinas, o que leva ao aumento de susceptibilidade à infecções secundárias. As células B e suas precursoras não são suscetíveis à infecção (ADAIR, 2000; FLORES, 2007). A repopulação do timo com linfócitos, da medula óssea com proeritroblastos, e recuperação da atividade hematopoietica, começam 16 dias pós infecção, e

coincide com o início da formação de anticorpos (YUASA, 1983, apud SCHAT e van SANTEN, 2008).

Em aves com idade superior a três semanas, a infecção é geralmente subclínica, mas, mesmo assim, pode causar perdas significativas. A infecção nestas aves também resulta em supressão de células T, produz alterações na função de macrófagos e de outras células responsáveis pela fagocitose, apresentação de抗ígenos e produção de citocinas, mas dificilmente acompanham sinais clínicos (ADAIR, 2000). A apresentação clínica mais importante ocorre em aves jovens. Nesses animais, são observados diversos graus de anemia, palidez na musculatura, barbela e crista, depressão e desuniformidade no lote.

As lesões macroscópicas mais importantes incluem hipotrofia de timo e alterações de coloração de medula do fêmur. Hemorragias musculares e subcutâneas ou no proventrículo também podem ser observadas, como resultado da diminuição de trombócitos(GORYO *et al.*, 1985).

A infecção por CAV representa uma séria ameaça econômica para a indústria de frango e produtores de aves SPF (*Specific Pathogen Free*). Plantéis infectados podem ter crescimento retardado e mortalidade entre 10 e 20%, ocasionalmente alcançando 60% (GORYO *et al.*, 1985). Existem relatos de que a doença pode levar a perda de cerca de 18% do lucro líquido, devido à diminuição do ganho de peso e mortalidades (McLLROY *et al.*, 1992). É provável que a doença subclínica seja subestimada, uma vez que esta pode reduzir o desenvolvimento de linfócitos T antígeno específico de forma significativa (MARKOWSKI-GRIMSRUD; SCHAT, 2003), além de causar efeitos na função de macrófagos (McCONNEL; ADAIR; McNULTY, 1993).

## 2.1.2 Medidas de controle

As principais medidas de controle para CAV visam limitar a transmissão vertical e prevenir as coinfecções com outros agentes imunossupressores. Em condições naturais de campo os lotes de reprodutoras se infectam em recria e transmitem anticorpos maternais protetores para a progênie. A utilização de vacinas vivas atenuadas confere uma imunização precoce nos lotes susceptíveis, competindo ativamente contra o vírus de campo e seus efeitos deletérios na capacidade imunológica das aves. A imunização das reprodutoras deve ser feita algumas semanas antes do início da produção(SCHAT e van SANTEN, 2008). O monitoramento constante dos anticorpos contra CAV é importante para evitar a doença por transmissão vertical e também para testar a eficácia das vacinas utilizadas.

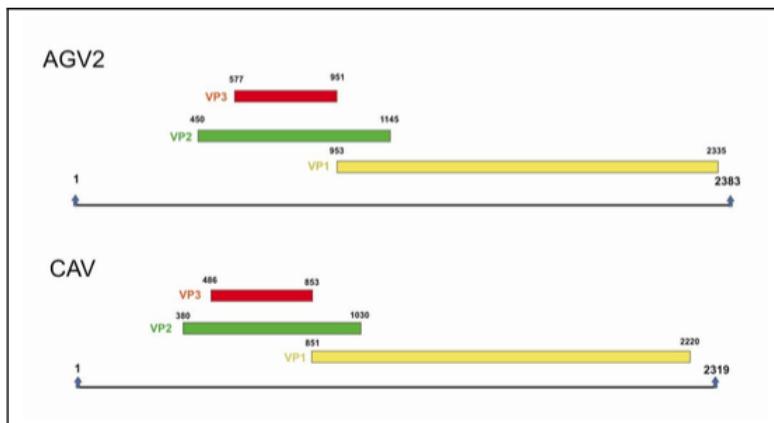
## 2.1.3 Diagnóstico de CAV

O diagnóstico de CAV pode ser feito através do isolamento viral, detecção de genes específicos ou pela detecção de anticorpos (SCHAT e van SANTEN, 2008). O isolamento viral por cultivo *in vitro* é limitado e bastante dispendioso, uma vez que são necessários vários dias de cultivo e sub-cultivo, além da existência de amostras que não replicam em cultura celular, o que pode resultar em falsos negativos (ISLAM *et al.*, 2002).

## 2.2 GIROVÍRUS AVIÁRIO TIPO 2 (AGV2)

Em estudos recentes, utilizando soro de aves com manifestações clínicas de perda de peso e má nutrição, foi descoberto um novo vírus aviário, nomeado Girovírus aviário tipo 2 (AGV2). Este vírus possui um genoma circular, com tamanho, organização genômica, além de uma similaridade nucleotídica de 40% com o Vírus da Anemia das Galinhas. Observou-se que ORF 1 possui uma sequência de amino ácidos com 40,3% de similaridade com a proteína VP2 de CAV, uma proteína importante na replicação viral, citopatologia e virulência. A sequência de ORF 2 possui 32,2% de identidade com VP3 de CAV, uma proteína não estrutural, apoptina. E a ORF 3 codifica uma sequência de amino ácidos com 38,8% de similaridade à proteína VP1 de CAV, uma proteína estrutural do capsídeo (Figura 3) (RIJSEWIJK *et al.*, 2011).

**Figura 3** – Comparação da estrutura genômica, em forma linear, do Girovírus Aviário tipo 2 (AGV2) com o Vírus da Anemia das Galinhas (CAV).



Fonte: SANTOS *et al.*, 2012.

Após sua descoberta, AGV2 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). Foi detectado, também, em espécies selvagens, onde amostras de animais doentes e saudáveis foram submetidas à investigação do vírus por PCR (Lima et al. 2012). A presença do vírus em aves selvagens pode ter implicações na sua manutenção e dispersão na natureza, embora seu papel como vírus patogênico para estes animais ainda não seja comprovado.

Semelhante a outros *Circovírus*, o AGV2 parece ser bastante resistente na natureza.O vírus permanece em seu estado infeccioso mesmo após o tratamento fermentativo realizado na cama de aviários, previamente utilizada por aves AGV2 positivas (ESTEVES et al., 2012). O DNA de AGV2 também permanece na superfície de insetos *Alphitobius dioperinus* (cascudinho), comumente encontrado em criações comerciais, que é capaz carrear e preservar o vírus (COSTA et al., 2012).

Ao passo que variações de nucleotídeos no genoma de CAV já foram descritas, permitindo a classificação deste vírus em quatro grupos distintos (ELTAHIREt al., 2011), estudos sobre a epidemiologia molecular de AGV2 ainda são escassos e, acredita-se,talvez exista uma maior variação genômica entre as diferentes cepas de AGV2 do que entre as diferentes cepas de CAV (SANTOS et al., 2012).

Em um estudo realizado com amostras clínicas de frangos do sul do Brasil e da Holanda, Santos et al. (2012) obteve 100% de amostras positivas para AGV2, em animais que possuíam sinais de crescimento retardado, perda de peso e/ou lesões cerebrais. Na Holanda, a frequência de animais positivos para AGV2, entre galinhas que mostravam lesões cerebrais, foi de 42,9% (SANTOSet al., 2012). No entanto, mais estudos devem ser realizados a fim de avaliar a real

distribuição do vírus em outras regiões geográficas.

Assim, conforme as descrições da literatura, ainda não está claro o papel desempenhado pelo AGV2 como agente etiológico de imunossupressão em aves comerciais. O fato de que o DNA do AGV2 pôde ser detectado também em amostras de galinhas saudáveis dificulta o estabelecimento de uma associação entre o vírus e o desenvolvimento da doença.

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo geral identificar a presença do Vírus da Anemia das Galinhas(CAV) e Girovírus Aviário tipo 2(AGV2) em plantéis de aves comerciais, localizadas nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, além de realizar a caracterização molecular das amostras de vírus AGV2 isoladas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 COLETA DE MATERIAL

Para realização do experimento foram utilizadas 180 aves comerciais, desejis granjas distintas,sendo 90 provenientes da região de Nova Petrópolis (RS), e90 aves da região de Taió (SC) (Figura 4 ).

**Figura 4** – Mapa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul.



Legenda: Marcação em triângulo representa a localização aproximadada cidade de Taió, e o círculo representa a localizaçãoproximada da cidade de Nova Petrópolis.

Fonte: adaptado Google imagens.

A primeira etapa de coletas foi realizada no mês de dezembro de 2013, em granjas da região de Nova Petrópolis. Nesta etapa, um total de 90 aves necropsiadas no laboratório MERCOLAB foram utilizadas para a coleta de material. Estas aves eram provenientes de 3 granjas distintas (Granjas A, B e C), e as coletas realizadas em seis idades de 1, 7, 14, 21, 35 e 42 dias, em cada coleta foram selecionadas cinco aves de forma aleatória.

A segunda etapa de coletas foi realizada nos meses de Abril/Maio 2014. Nesta etapa, foram utilizadas 90 aves necropsiadas no laboratório de Patologia Aviária Animal – UDESC, provenientes de granjas da região de Taió. Assim como na primeira etapa, as aves eram provenientes de 3 granjas distintas (Granjas D, E e F), e as coletas realizadas em seis idades de 1, 7, 14, 21, 35 e 42 dias, em cada coleta foram selecionadas cinco aves de forma aleatória.

Em cada animal era realizada coleta de fragmentos de sistema nervoso central, medula óssea, timo, baço, rim, traqueia, pulmão, músculo, coração, fígado, pró-ventrículo, gônadas, ceco e Bursa de Fabricius. As amostras foram armazenadas em ultra-freezer -80°C, no laboratório CEDIMA – UDESC, para posterior extração de DNA total, na EMBRAPA – Suínos e Aves. Para a realização do presente trabalho foram utilizadas as 180 amostras de timo coletadas.

### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA total dos fragmentos de timo foi realizada com kit comercial DNeasy Blood & Tissue – QIAGEN, conforme instruções do fabricante.

### 3.3 DETERMINAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA CONCENTRAÇÃO DO DNA

A quantidade e a pureza do DNA foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro BioDrop a 260 nm e 280 nm e sua razão. O DNA foi diluído para 20 ng/ $\mu$ l. Todas as amostras foram estocadas a -20°C até posterior utilização para reação de PCR.

### 3.4 CONDIÇÕES DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E *Nested*-PCR PARA DETECÇÃO DE CAV

Para a detecção de CAV, a técnica utilizada foi a *Nested*-PCR. A PCR inicial foi realizada utilizando o par *deprimers* externos VP3F e VP1R (Tabela 1), que amplificam um fragmento de 713 pb (que abrange todo o gene VP3, parte dogene VP2 e parte da região N-terminal de VP1). Para cada reação, com volume final de 25  $\mu$ l, foi utilizado 100 ng de DNA da amostra, 1,0  $\mu$ l/MgCl<sub>2</sub>(50 mM), 2,5  $\mu$ l/PCR Buffer (10x), 10  $\mu$ M de cada *primer*, 1,25 U/Taq DNA polimerase e 2.0  $\mu$ l/dNTP (10 mM). A reação de amplificação foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial de 2 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 2 minutos), anelamento (52°C por 1 minuto), extensão (72°C por 1 minuto) e uma extensão final de 72°C por 3 minutos.

Para a segunda reação da *Nested*-PCR foram utilizados os *primers* internos N3 e N4(Tabela 1), que amplificam um fragmento de 210 pba partir do *amplicom* da PCR descrita logo acima. Cada reação possuía um volume final de 25  $\mu$ l, contendo 2  $\mu$ l da reação de amplificação com *primers* externos previamente diluídos (1:20), 1,0  $\mu$ l/MgCl<sub>2</sub>(50 mM), 2,5  $\mu$ l/PCR Buffer (10x), 10  $\mu$ M de cada *primer*, 1.0 U/Taq DNA polimerase e 2.0  $\mu$ l/dNTP (10 mM). A reação de amplificação foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial de 7 minutos

a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C por 30 segundos), anelamento (62°C por 30 segundos), extensão (72°C por 30 segundos) e uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

### 3.5 CONDIÇÕES DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA DETECÇÃO DE AGV2

Para a reação de AGV2, através da técnica de PCR convencional, foi utilizado o par de *primers* AGVF e AGVR (Tabela 1), que amplificam uma região da proteína VP2 de 345 pb. Para cada reação foi utilizado 1,0 µl/ MgCl<sub>2</sub>(50 mM), 2,5 µl/ PCR Buffer (10x), 10 pM de cada *primer*, 1,25 U/*Taq* DNA polimerase, 0,5 µl/ dNTP (10 mM), 100 ng da amostra de DNA e H<sub>2</sub>O Milli-Q estéril para um volume final de 25 µl. A reação foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial de 7 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturação (94°C – 30 segundos), anelamento (62°C – 30 segundos) e extensão (72°C – 30 segundos), e um ciclo de extensão final a 72°C por 7 minutos.

**Tabela 1**– Sequênciados iniciadores utilizados neste estudo para a detecção de AGV2 e CAV.

Vírus	Primers	Sequência (5' → 3')	Produto	Autores
CAV	VP3	GCGCAGGGGCAAGTAATT		Nogueira et al., 2007.
	VP1	GTTCACAGAGATCTTGGCGACT	713 pb	
	N3	CCACCCGGACCAATCAAC		Cardona et al., 2000.
	N4	GGTCCTCAAGTCCGGCACATT	210 pb	
AGV2	AGVF	CGTGTCCGCCAGCAGAAC		Santos et al., 2012.
	AGVR	GGTAGAAGCAAAGCGTCCAC	345 pb	

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

### 3.6 ANÁLISE DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

A visualização dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 0,5X (100mM Tris-base pH 8.3, 25 mM EDTA e 50 mM ácido bórico), corado com Brometo de Etídio na concentração de 10 mg/ml. Para cada amostra foi utilizado o volume total do produto amplificado, e adicionados 2 µL do *loading buffer* 2X (60% de glicerol, 10% de TBE 10X e azul de bromofenol). A eletroforese foi realizada a 100V por 40 minutos, sendo utilizados os padrões de tamanho molecular de 100 pb DNA *Ladder* ou 1 kb DNA *Ladder*. Os resultados foram visualizados em um transiluminador UV.

### 3.7 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Onze *amplicons* obtidos a partir de amostras analisadas (19, 22, 27, 48, 55, 74, 77, 81, 104, 145, 147) foram selecionados, purificados do gel de agarose com o kit *PureLink™ Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit* (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante, e sequenciados (ABI 3130 – Applied). As sequências consenso foram obtidas com o auxílio do programa *Contig Express* (Vector NTI- Invitrogen) e o alinhamento e análise filogenética foram realizados utilizando-se o programa MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011). As sequências obtidas no presente trabalho foram comparadas com material previamente sequenciado e analisado (SANTOS *et al.*, 2012), além das seguintes sequências utilizadas como referência: HM590588.1; JQ690763.1; KJ452214.1; KJ452213.1; KF436510.1 e FR823283.1.

O alinhamento da sequências foi realizado utilizando-se o programa MUSCLE que compõe o pacote de programas MEGA 5.0 (TAMURA *et al.*, 2011). Após, para verificação da confiabilidade do alinhamento, foi calculada a Distância Geral Média/ *Overall Mean Distance* (0,024) e selecionado o modelo

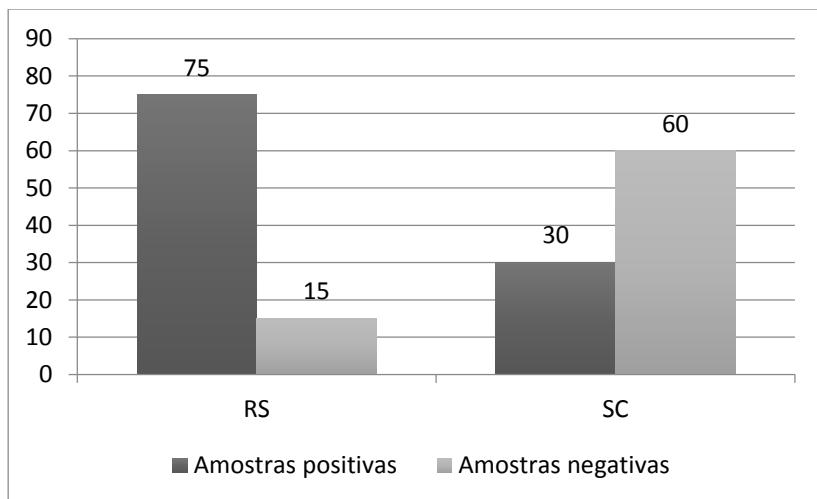
matemático a ser utilizado na construção da árvore filogenética, que foi construída baseada no modelo *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987) , utilizando-se 1000 *bootstraps* (FELSENSTEIN, 1985). A distância evolucionária foi calculada utilizando-se o modelo matemático *Jones-Taylor-Thornton* (JTT) (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992), conforme determinado pelo próprio software MEGA 5.0.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AMPLIFICAÇÃO DE CAV

O DNA de CAV foi detectado em 58,33% (105/180) amostras testadas no presente trabalho (Gráfico 1).

**Gráfico1** – Demonstração do número de animais positivos obtidos por *Nested-PCR* para pesquisa do CAV nos estados RS e SC.



Fonte: Produção da própria autora, 2015.

Das 105 amostras positivas, 83,33% (75/90) eram provenientes do RS e 33,33% (30/90) de SC (Gráfico 1). A granja B do RS teve o maior número de casos positivos (28 aves) e, a granja F, de SC, não obteve nenhum resultado positivo para o vírus (Tabela 2).

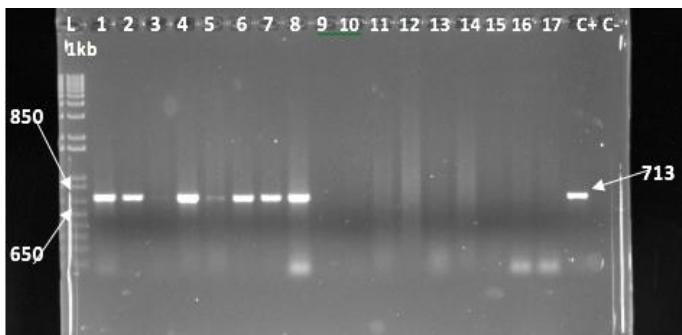
**Tabela 2** – Resultados obtidos para pesquisa de CAV em granjas do RS (A,B,C) e SC (D,E,F).

GRANJA/ IDADE	RS			SC		
	A	B	C	D	E	F
<b>1 DIA</b>	1/5	5/5	5/5	5/5	3/5	0/5
<b>7 DIAS</b>	3/5	5/5	5/5	5/5	2/5	0/5
<b>14 DIAS</b>	2/5	4/5	4/5	5/5	5/5	0/5
<b>21 DIAS</b>	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	0/5
<b>35 DIAS</b>	5/5	4/5	3/5	0/5	3/5	0/5
<b>42 DIAS</b>	5/5	5/5	5/5	1/5	1/5	0/5
<b>TOTAL</b>	21	28	26	18	14	0

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

Enquanto na reação inicial do *Nested*-PCR para pesquisa do CAV, utilizando *primers* externos, foi possível observar um produto amplificado de 713 pb em 12 amostras (Figura 5), na segunda reação, utilizando *osprimers* internos, foi possível observar a amplificação do produto de 210 pb em 105 das 180 (58,33%) amostras (Figura 6).

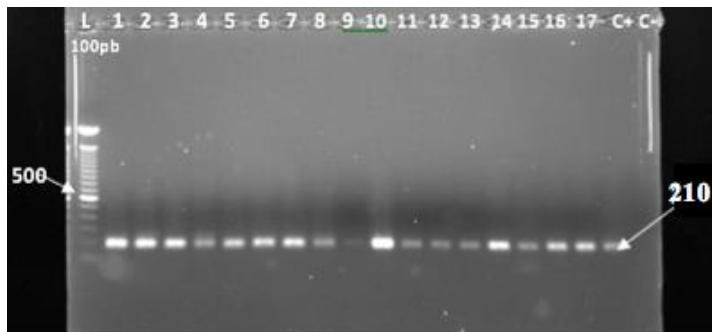
**Figura 5** - Resultados parciais obtidos para a PCR realizada para CAV utilizando os *primers* externos VP1/VP3, e amplificação de um fragmento de 713 pb, nem sempre possível de ser visualizada.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1%. L: Padrão de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder, C+: controle positivo, C-: controle negativo. Amostras de timo 1 – 8 positivas para CAV, e amostras 9 – 17 negativas.

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

**Figura 6** - Resultados parciais obtidos para a *Nested-PCR* realizada para CAV, utilizando os *primers* internos N3/N4 com amplificação de um fragmento de 210 pb.



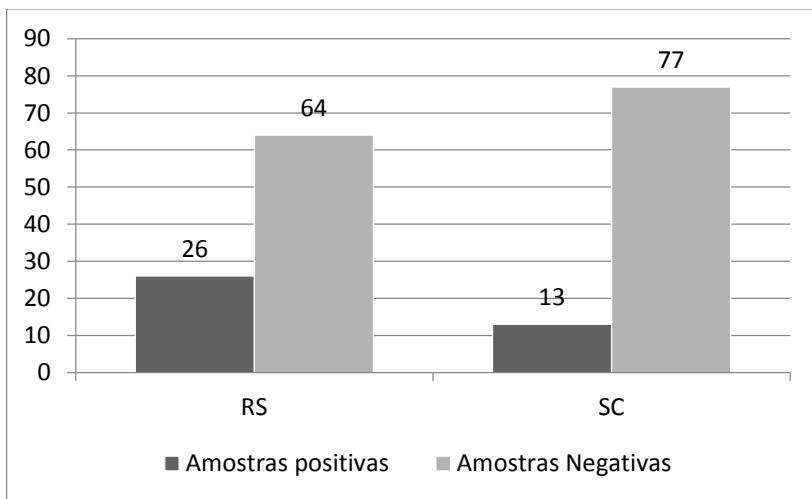
Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1%. L: Padrão de tamanho molecular 100 pb DNA Ladder, C+ controle positivo, C- controle negativo. 1 – 17 amostras de timo todas positivas para CAV.

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

## 4.2 AMPLIFICAÇÃO DE AGV2

Das 180 amostras analisadas, 21,76% (39/180) foram positivas para o AGV2, sendo 28,89% (26/90) destas provenientes do estado do RS e 14,44% (13/90) do estado de SC (Gráfico 2).

**Gráfico2** – Demonstração do número de animais positivos obtidos por PCR para pesquisa do AGV2 nos estados RS e SC.



Fonte: Produção da própria autora, 2015.

A granja C (RS) teve a maior quantidade de animais positivos para AGV2 (10 aves), e a granja F (SC), novamente, não possuiu nenhum resultado positivo para o vírus (Tabela 3).

**Tabela 3** - Resultados obtidos para pesquisa de AGV2 em granjas do RS (A,B,C) e SC (D,E,F).

IDADE/ GRANJA	RS			SC		
	A	B	C	D	E	F
<b>1 DIA</b>	0/5	1/5	0/5	5/5	0/5	0/5
<b>7 DIAS</b>	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<b>14 DIAS</b>	0/5	0/5	1/5	2/5	0/5	0/5
<b>21 DIAS</b>	2/5	4/5	1/5	2/5	0/5	0/5
<b>35 DIAS</b>	3/5	2/5	4/5	0/5	3/5	0/5
<b>42 DIAS</b>	2/5	2/5	4/5	0/5	1/5	0/5
<b>TOTAL</b>	6	9	10	9	4	0

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

A Figura 7 demonstra alguns dos resultados visualizados pela PCR realizada para AGV2, que gerou um produto de amplificação com tamanho de 345 pb.

**Figura 7** - Resultado parciais obtidos para a PCR realizada para AGV2, utilizando os primers AGVF/AGVR com amplificação de um fragmento de 345 pb.



Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1%. L: Padrão de tamanho molecular 1 kb DNA Ladder, C+: controle positivo, C-: controle negativo. Amostras de timo 1 - 5 positivas para AGV2, e amostras 6 – 12 negativas.

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

#### 4.3 SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Das amostras testadas para AGV2, 11 foram selecionadas para realização do sequenciamento e análise filogenética (Figuras 8 e 9).

Como pode ser visualizado na figura 8, três (19, 22 e 27) das onze sequências de aminoácidos de AGV2, provenientes de uma mesma granja (granja A/RS) foram 100% idênticas entre si e entre a maioria das amostras de AGV2 anteriormente descritas no Brasil, bem como, com a primeira sequência de AGV2 (HM590588) obtida e depositada no NCBI (RIJSEWIJK *et al.* 2011). Estas três amostras (19, 22 e 27) foram obtidas de animais sem alterações significativas na necropsia, mas, provenientes de uma granja com alta mortalidade e refugagem.

**Figura 8 – Comparação da sequência de aminoácidos de VP2 de AGV2 obtidas durante o experimento.**



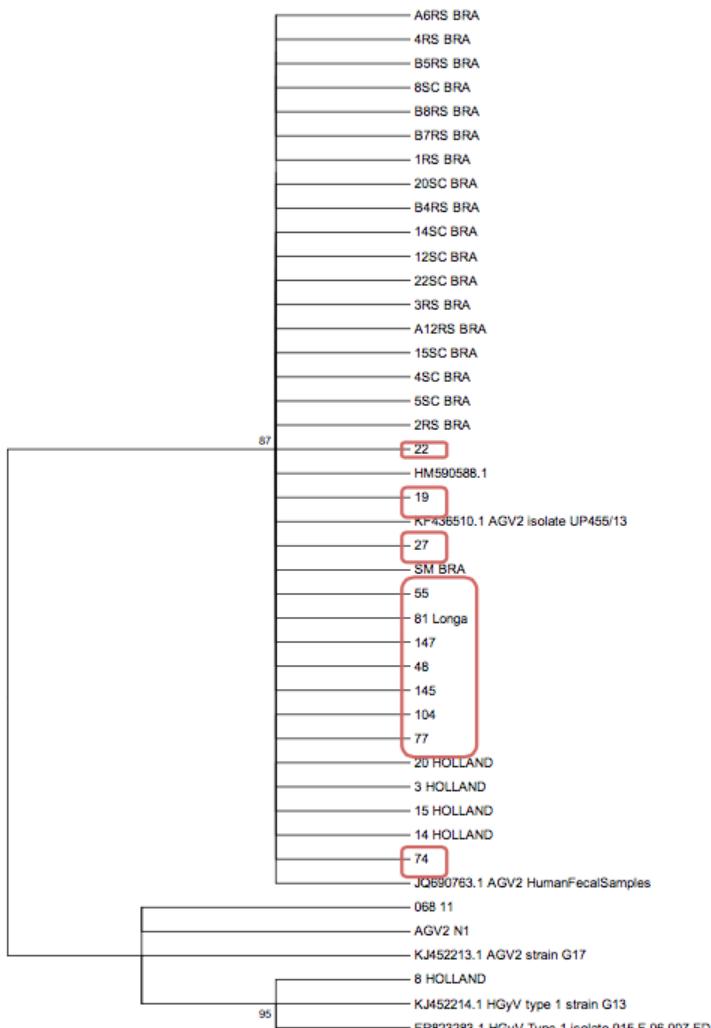
Legenda: HM590588 corresponde a primeira sequência de AGV2 depositada na NCBI. Amostras 19, 22, 27, 48, 55, 74, 77, 81 Longa, 104, 145 e 147 obtidas de aves de granjas dos estados de SC e RS.

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

As outras oito sequências (48, 55, 74, 77, 81, 104, 145, 147) apresentaram mudança em apenas um aminoácido de VP2 em relação às sequências obtidas nas amostras da Granja A e a sequência HM590588, mas foram correspondentes às sequências de AGV2 obtidas na Holanda de animais que apresentavam lesões no SNC. Estas oito amostras foram obtidas estado do RS, das granjas B (48, 55), granja C (74, 77 e 81) e do estado de SC, das granjas D (104) e granja E (145 e 147), nenhum destes animais apresentou alterações significativas individuais durante a necropsia.

Utilizando as onze sequências dos produtos de PCR de AGV2 selecionados, além das sequências de referência, foi construída a árvore filogenética (Figura 9). A árvore apresenta dois grupos: um composto pela maioria das amostras brasileiras (prefixo BRA), as sequências analisadas neste trabalho, as amostras sequenciadas na Holanda (HOLLAND) e uma amostra de AGV2 sequenciada a partir de fezes humanas (AGV2 HumanFecalSamples); e o outro grupo formado por amostras obtidas de aves doentes na Holanda e Brasil (068 11, AGV2 N1, 8 HOLLAND) e amostras de Girovírus Humano obtidas a partir da material biológico de humanos (FR823283 HGyV, KJ452214 HGyV) (Figura 9).

**Figura 9.** Análise filogenética das sequências de nucleotídeos de AGV2 avaliadas.



Legenda: Amostras sequenciadas no presente trabalho estão evidenciadas com um círculo. A análise filogenética foi conduzida utilizando-se o programa MEGA 5.0 e inferida através da metodologia Neighbor-Joining, sendo que, a análise consenso de bootstrap foi gerada a partir de 1000 réplicas e a distância evolucionária foi calculada utilizando-se o modelo matemático Jones-Taylor-Thornton (JTT) .

Fonte: Produção da própria autora, 2015.

## 5 DISCUSSÃO

Este trabalho teve como objetivo a detecção de dois vírus de galinhas pertencentes à família *Circoviridae*, o Vírus da Anemia das Galinhas e o Girovírus Aviário tipo 2, e análise filogenética de amostras de AGV2 detectadas, em aves comerciais de seis granjas localizadas nos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (3/SC e 3/RS). Para abranger todo o ciclo de produção foram realizadas coletas de material biológico de aves de 1 dia até 42 dias. Com um total de 180 amostras de timo, um dos órgãos onde ocorre a replicação primária de CAV e, possivelmente, de AGV2.

Embora tenha-se muito conhecimento e material à respeito da infecção de CAV em aves de produção, poucos trabalhos foram desenvolvidos com relação à presença e caracterização molecular de AGV2 em plantéis comerciais, por isso a importância de mais estudos moleculares para esclarecer uma possível origem e evolução do vírus, além da sua epidemiologia.

Com relação à detecção do CAV, em um total de 180 amostras analisadas (90/RS e 90/SC), 105 (58,33%) foram positivas pela técnica de *Nested-PCR*. A técnica utilizada tem sido descrita por vários autores como uma forma de amplificação de CAV, sendo muito útil para a pesquisa do vírus em aves com a doença subclínica, por ser uma técnica muito sensível e específica (CARDONA; OSWAL; SCHAT, 2000; SIMIONATTO *et al.*, 2005).

Através desta técnica, foi possível verificar que 90 amostras de timo provenientes do RS, 75 (83,33%) foram positivas para CAV e, das 90 amostras obtidas no estado de SC, 30 (33,33%) foram positivas. Estes resultados reforçam a hipótese de que o vírus se encontra disseminado em granjas de SC e RS. Estando de acordo com estudos prévios realizados com matrizes pesadas onde foi demonstrado que o CAV está amplamente disseminado na avicultura comercial do Brasil,

com maior prevalência nos estados de mais alta densidade avícola (BRENTANO *et al.*, 2000). Um dos fatores que poderia explicar o menor número de resultados positivos nas granjas analisadas no presente estudo, originárias do estado de SC, uma vez que a região na qual as aves estavam alojadas não é de alta densidade avícola ou as granjas avaliadas estavam alojando animais pela primeira vez.

Acredita-se que uma das possíveis causas da disseminação do CAV ocorreu pelo uso de vacinas com vírus vivo para imunização contra outras doenças que poderiam estar contaminadas com o CAV (BARRIOS *et al.*, 2012). Em seu trabalho, Barrios *et al.* (2012), relata a presença de CAV em vacinas produzidas no período de 1991 até 2005, onde 19% das vacinas testadas (especialmente as produzidas no período de 1991 a 2001) apresentaram-se contaminadas com CAV. O trabalho enfatiza uma possível melhora na qualidade a partir de 2001, mas, Varela *et al.* (2014), ao avaliar vacinas vivas com produção mais recente, provenientes de laboratórios de diversos países, obtiveram 7 resultados positivos para a presença do genoma do CAV em vacinas produzidas para imunização contra outros vírus. A detecção do genoma viral pode indicar o risco da presença do vírus infeccioso em tais vacinas, especialmente tendo conhecimento sobre a natureza altamente resistente dos vírus avaliados e pela vacina viva ser formulada para preservar a infectividade dos vírus ali presentes, para a indução de adequada resposta imune.

Outra hipótese para a disseminação do vírus, é de que a presença do CAV nas linhagens comerciais já existia antes da descoberta do vírus, desde pelo menos o ano de 1959, e a falta de programas de controle permitiram sua disseminação (TORO; EWALD; HOERR, 2006). No trabalho de Toro *et al.* (2006), foi avaliada a presença de anticorpos para CAV no soro de aves adultas dos EUA, dos períodos de 1959 até 2005, e obtiveram uma porcentagem de animais positivos variando de

43% até 100%, o que suporta a hipótese da sua presença antes do primeiro isolamento no país.

Acredita-se, também, que adissemiação do CAV pode ser resultado da permanência do DNA viral em matrizes e sua progênie, mesmo após vacinação. Brentano *et al.* (2005), relata a presença do vírus nas gônadas de animais que possuíam altos títulos de anticorpos neutralizantes, e que este vírus também estaria presente nas progênies geradas, sugerindo que a persistência do vírus em matrizes seria uma forma de transmissão vertical intermitente, e assim, levando a surtos clínicos nas progênies.

Com relação à detecção do AGV2, os resultados obtidos pela técnica de PCR convencional foram semelhantes aos do CAV, pois houve a presença do vírus em maior número no RS (28,9%) e menor em SC (14,44%), mas comum total de aves positivas para AGV2 menor, de apenas 21,7%. Poucos estudos foram realizados relatando a detecção de AGV2, mas, acredita-se que esteja disseminado em plantéis comerciais, assim como o CAV (SANTOS *et al.*, 2012).

Das 6 granjas avaliadas, na granja F não houve a amplificação do vírus AGV2 pela técnica de PCR em nenhuma das amostras. Sabendo-se que era uma granja nova e, que nunca havia alojado aves anteriormente, torna possível ressaltar a importância de alguns fatores, tais como, biossegurança, manejo, sinergismo dos vírus com outros agentes imunossupressores, para manter a sanidade das produções avícolas (BRENTANO *et al.*, 2000). Outro fator de grande importância é o tempo de produção no local, a alta resistência do vírus à inativação física e química, mesmo após o tratamento fermentativo da cama aviária (ESTEVES *et al.*, 2012), o que permite a permanência do vírus em seu estado infeccioso por longos períodos.

Ao avaliar a presença dos vírus em animais com diferentes idades, utilizadas no presente trabalho, não foi

possível construir uma relação entre aves positivas para o CAV ou AGV2 às diferentes idades de 1, 7, 14, 21, 35 e 42 dias.

Para o sequenciamento, um total de 11 *amplicons* de AGV2 foram selecionados, destes, oito *amplicons* obtidos do timo de aves comerciais de ambos os estados de RS e SC demonstraram alterações na sequência de aminoácidos, nos quais, houve diferença somente em um destes (T→A) na posição 165, entretanto, não houve interferência significativa na construção da proteína. A literatura descreve que alterações em determinados aminoácidos VP2 poderiam levar a modificações em funções essenciais para a replicação viral, como a capacidade de interação com o núcleo da célula hospedeira, mas não foi possível detectar tais modificações no presente trabalho (CHENG *et al*, 2012). Os demais três *amplicons*, obtidos de uma mesma granja do RS (granja A), foram idênticos entre si e com a sequência HM590588.

Na análise filogenética, todas as amostras de AGV2, analisadas neste trabalho, puderam ser filogeneticamente agrupadas juntamente com a sequência HM590588, portanto, não foi possível criar uma distinção entre as amostras analisadas no presente trabalho. Além de estarem agrupadas com a maioria das amostras analisadas no Brasil (BRA), também foram agrupadas com uma sequência detectada a partir de fezes humanas. Descrita por Phan *et al* (2012), a amostra (AGV2 HumanFecalSamples) foi detectada em fezes de crianças com sinais clínicos de diarreia.

Com os resultados obtidos na análise filogenética, os diversos AGV2 detectados no presente trabalho foram considerados como pertencentes a um grupo distinto do Girovírus Humano (KJ452214 HGyV e FR823283 HGyV), e das amostras isoladas de aves com lesões do Brasil e Holanda (8 HOLLAND, AGV2 N1). Em 2011, Sauvage *et al*. descrevem a descoberta de um novo Girovírus em material biológico de sangue e pele em humanos, sendo nomeado Girovírus Humano (HGyV). Assim como AGV2, o HGyV tem

grande similaridade nucleotídica com CAV, e diversos estudos vem sendo realizados para avaliar seu potencial patogênico, epidemiologia e propriedades biológicas, uma vez que já foi isolado a partir de material genético proveniente de humanos saudáveis e doentes.

A grande semelhança entre HGyV e AGV2 reforça a necessidade de estudos de caracterização molecular para o melhor entendimento de sua evolução. Um estudo realizado por Phan *et al.*(2012), sugere a possibilidade de transmissão cruzada de AGV2 e HGyV entre espécies devido à sua proximidade genética, como ocorre com outros vírus animais. Além disso, a presença destes vírus em fezes de humanos e animais pode estar relacionada ao consumo de carne de frango infectada. Ademais, a presença destes girovírus na pele e corrente sanguínea de humanos pode ser um indicativo de que também ocorram infecções cruzadas entre humanos e aves (BIAGINI *et al.*, 2013; CHU *et al.*, 2012; MAGGI *et al.*, 2012).

Um melhor conhecimento da diversidade genética destes vírus recém descobertos poderá permitir o desenvolvimento de melhores sistemas de detecção molecular e a sua posterior utilização em estudos epidemiológicos envolvendo diversos grupos de vírus.

## 6 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível concluir que os *Girovírus*, CAV e AGV2, estão presentes em plantéis de aves comerciais nas duas regiões estudadas do Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

A partir dos dados obtidos na análise filogenética de onze sequências nucleotídicas descritas neste trabalho (região da VP2 de AGV2), foi possível verificar que todas as sequências analisadas apresentaram grande similaridade com outras sequências da VP2 de AGV2 de aves anteriormente estudadas, independentemente da condição de saúde dos diferentes lotes analisados. Além disso, as sequências aqui obtidas apresentaram-se como um grupo distinto do grupo onde encontram-se sequências provenientes de material biológico de sangue e pele de seres humanos, utilizadas como referência na presente análise.

Não foi possível, neste trabalho, através da análise filogenética da região da VP2 aqui avaliada, fazer a distinção entre AGV2 detectado em aves que estavam e que não apresentando problemas relacionados com imunossupressão. No entanto, os estudos aqui apresentados, servirão como base para futuras investigações buscando estabelecer correlações entre infecções causadas por estes agentes infecciosos.

Trabalhos futuros avaliando filogeneticamente outras regiões do genoma podem revelar alterações significativas, que poderão ajudar a esclarecer aspectos epidemiológicos envolvendo a evolução e patogenia do vírus estudado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAIR, B.M. Immunophatogenesis of chicken anemia vírus infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, p. 247-255, 2000.
- BARRIOS, P.R.*et al.* A retrospective PCR investigation of avian *Orthoreovirus*, chicken infectious anemia and fowl *Aviadenovirus* genomes contamination in commercial poultry vaccines in Brazil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 64, p. 231-235, 2012.
- BIAGINI, P. *et al.* Human gyrovirus in healthy blood donors, France. **Emer. Infec. Diseases**, v. 19, p. 1014-1015, 2013.
- BRENTANO, L. *et al.* Isolation and identification od chicken infectious anemia vírus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 35, p. 793-800, 1991.
- BRENTANO, L. *et al.* Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte no Brasil. **Rev. Bras. de Ciência Avícola**, v. 2, n. 2, p. 157-179, 2000.
- BRENTANO, L. *et al.* Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. **Vet. Microbiology**, v. 105, p. 65-72, 2005.
- CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B.; SCHAT, K.A. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2067-2075, 2000.

CHENG, J., *et al.* Identification of the NLS and NES motifs of VP2 from chicken anemia virus and the interaction of VP2 with mini-chromosome maintenance protein 3. **BMC Vet Res**, v. 8, p. 1-12, 2012.

CHU, D.K.W., *et al.* Characterization of a novel gyrovirus in human stool and chicken meat. **Journal of Clinical Virology**, v. 55, p. 209-213, 2012.

COSTA, C., *et al.* 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.

CROWTHER, R.A., *et al.* Comparison of the structures of three circoviruses: Chicken anemia virus, Porcine circovirus type 2, and Beak and feather disease virus. **Journal of virology**, v. 77, p. 13036-13041, 2003.

ELTAHIR, Y.M., *et al.* Analysis of chicken anemia virus genome: evidence of intersubtype recombination. **Virology Journal**, v. 8, p. 512, 2011.

ESTEVES, P.A., *et al.* Molecular detection of avian Gyrovirus type 2 (AGV2) in specific pathogen free (SPF) chickens housed on commercial broiler litter. **World's Poultry Science Journal**, p. 324-326, 2012.

FELSETERIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v.39, p. 783-791, 1985.

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

GORYO, M. *et al.* Isolation of an agent inducing chicken anaemia. **Avian Pathology**, v. 14, p. 483-496, 1985.

GORYO, M. *et al.* Serial propagation and purification of chicken anaemia agent in MDCC-MSB1 cell line. **Avian Pathology**, v. 16, p. 149-163, 1987.

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

ISLAM, M.R. *et al.* Sequence analysis of the full-length cloned DNA of chicken anemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence for genetic grouping of CAV strain based on the deduced amino acid sequence. **Jounal Veterinary Medicine B**, v.49, p. 332-337, 2002.

JONES D.T.; TAYLOR W.R.; THORNTON J.M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Compu. App. in the Biosciences**, v.8, p. 275-282, 1992.

KOCH, G.*et al.* Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. **Vaccine**, v. 13, p. 763-770, 1995.

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

MAGGI F. *et al.* Human Gyrovirus DNA in Human Blood, Italy. **Emer. Infec. Diseases**, v. 18, p. 956-959, 2012.

MARKOWSKI-GRIMSRUD, C.J.; SCHAT, K.A. Infection with chicken anemia virus impairs the generation of antigen-

specific cytotoxic T lymphocytes. **Immunology**, v. 109, p. 283-294, 2003.

McCONNEL, C.D.G.; ADAIR, B.M.; McNULTY, M.S. Effects of chicken anemia virus on cell mediated imune function in chickens exposed by natural route. **Avian Diseases**, v. 37, p. 367-374, 1993.

McLLROY, S.G. *et al.* Economic effects of clinical chicken anemia agente infection on profitable broiler production. **Avian Diseases**, v. 36, p. 566-574, 1992.

NOGUEIRA E. O. *et al.* Genome sequencing analysis of Brazilian chicken anemia virus isolates that lack MSB-1 cell culture tropism. **Comp. Imm., Mic. And Infec. Dises.**, v. 30, p. 81-86, 2007.

NOTEBORN, M.H.M., *et al.* Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome synthesis of its 52-kDa protein. **Gene**, v. 118, p. 267-271, 1992.

NOTEBORN, M.H.M. *et al.* Identification of the promoter region of chicken anemia virus (CAV) containing a novel enhancer-like elemente. **Gene**, v. 150, p. 313-318, 1994.

NOTEBORN, M.H.M., *et al.* Chicken anemia virus strains with a mutated enhancer/promoter region share reduced virus spread and cytopathogenicity. **Gene**, v. 223, p. 165-172, 1998.

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

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

PHAN, T.G.*et al.* A third gyrovirus species in human faeces. **Journal of General Virology**, v. 93, p. 1356-1361, 2012.

PHENIX, K. V., *et al.* Transcriptional analysis and genome expression of chicken anaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 905-909, 1994.

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.

SAITOU N. e NEI M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. **Mol. Bio. and Evolution**, v.4, p. 406-425, 1987.

SAUVAGE, V. Identification of the first human gyrovirus, a virus related to chicken anemia virus. **Journal of Virology**, v. 85, p. 7948–7950, 2011.

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**. 12<sup>th</sup> ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008, p. 209-235.

SHARMA, J. M. **Imunidade e doenças imunossupressoras das aves.** Disponível em:

<http://www.avisite.com.br/trabalhos.php?codigo=70>. Acesso: maio de 2015.

SIMIONATTO, S., *et al.* Um protocolo de “nested-PCR” para detecção do vírus da anemia das galinhas. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 25, p. 106-110, 2005.

TAMURA K. *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol. Biol. Evol.** v. 28, p. 2731–2739, 2011.

TODD, D. *et al.* Investigation of the transfection capability of cloned tandemly-repeated chicken anaemia virus DNA fragments. **Archives of Virology**, v. 141, p. 1523-1234, 1996.

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

TORO H.; EWALD S.; HOERR F.J. Serological Evidence of Chicken Infectious Anemia Virus in the United States at Least Since 1959. **Avian Diseases**, v. 50, p. 124-126, 2006.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2012**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>. Acesso: maio de 2015.

UBABEF - União Brasileira de Avicultura. **Relatório Anual 2014**. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/publicacoes>. Acesso: maio de 2015.

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

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

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

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