

DIAGNÓSTICO DE ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM MARRECOS DE PEQUIM POR PCR EM TEMPO REAL

Chanaísa Costa^{1*}; Alessandra D'Ávila²; Giseli Aparecida Ritterbusch³;
Tainá Eliza Klein⁴; Glaucio de Mattos⁵; Iara Maria Trevisol⁵;
Cintia Hiromi Okino⁵ e Paulo Augusto Esteves⁵

¹Graduanda em Ciências Biológicas, Universidade do Contestado, Campus Concórdia, SC, estagiária da Embrapa Suínos e Aves, bolsista CNPq/PIBIC, e mail: channaizsa@hotmail.com

²Pós-Doutorado Empresarial, CNPq

³Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Veterinária UFPel

⁴Ciências Biológicas, Universidade do Contestado, Concórdia, SC, bolsista da Embrapa Suínos e Aves

⁵Embrapa Suínos e Aves

Palavras-chave: anemia infecciosa das galinhas, marrecos de pequim, PCR em tempo real.

INTRODUÇÃO

O vírus da anemia das galinhas (CAV), pertence à família *Circoviridae*, gênero *Gyrovirus*. É uma doença de aves jovens, caracterizada por aplasia da medula óssea, mortalidade variável e atrofia generalizada de órgãos linfoides. Isolado pela primeira vez no Japão em 1979 o CAV pode, atualmente, ser detectado em criações comerciais e de subsistência em várias partes do mundo(7). No Brasil foi identificado no ano de 1991, em frangos de corte que apresentavam anemia, atrofia de timo e grande desuniformidade de desenvolvimento (2). Apesar de ser uma doença específica de galinhas, anticorpos contra CAV já foram detectados em codornas sendo que não há relatos da detecção direta ou indireta de tal vírus em outras espécies de aves domésticas ou selvagens (6). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo analisar a ocorrência do vírus da anemia infecciosa das galinhas através da técnica de PCR em tempo real em Marrecos de Pequim (*Anas platyrhynchos*) a partir da utilização da base da pena (Cálamo) como fonte de material. Esses animais tem como origem o nordeste asiático, tendo grande capacidade de adaptação em todo o mundo. Os rizicultores tem apostado na criação dessa espécie, pois, auxiliam no equilíbrio ecológico, sendo predadores de pragas e insetos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 91 penas de Marrecos de Pequim em cidades de Santa Catarina (Joinville, Guaramirim, Gaspar, Massaranduba, Jaraguá do Sul, Jaraguazinho e Timbó), durante o mês de agosto de 2011. As penas foram processadas no Complexo de Laboratórios de Genética e Sanidade Animal (CLGSA) da Embrapa Suínos e Aves sendo então testadas para a detecção de CAV por PCR em tempo real. Na extração do DNA, a parte terminal das penas (Cálamo) foi cortada em porções de cerca 0,5 cm. Posteriormente, tal material foi submetido à extração de material genético. As amostras de penas foram colocadas em microtubos e então adicionou-se 500 µL da solução de lise (Tris pH 8;0,1M; EDTA 0,5M; SDS 20%; proteinase K a uma concentração final de 175 mg/mL) (1). As amostras foram incubadas por 18 horas sendo, subsequentemente, agitadas e centrifugadas a 12.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e o DNA foi purificado com fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com etanol absoluto durante 15 minutos a -20 °C e ressuspenso em TE. O material foi então mantido a -20 °C até o uso. O DNA extraído foi quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop/ Techno Scientific®). Na reação de PCR foi utilizado um volume de 2,5µL (150 ng) de DNA, ao qual acrescentou-se 12,5µL de Quantifast SYBR Green (Qiagen®), 1pmol de cada primer "forward e reverse", completando-se com água até o volume final de 25µL. O método de PCR em tempo real foi realizado, utilizando o marcador SYBR Green I (Qiagen®), sendo a reação conduzida em um termociclador (Applied Biosystems – Real time - 7500). A reação de amplificação foi constituída por um ciclo de 95°C por cinco minutos seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por quinze segundos e anelamento a 60°C por 40 segundos, ao final desses 40 ciclos, foi realizada a dissociação dos produtos amplificados, entre as temperaturas de 65°C e 95°C, para a avaliação da Temperatura de Melting (Tm), e as leituras efetuadas a cada 0,1°C. Todas as amostras foram testadas, no mínimo, em duplicata. O valor do "Threshold Cycle" (CT) foi estabelecido como sendo o número de ciclos necessários para que a amostra analisada atinja a fluorescência de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A técnica de PCR em tempo real é descrita como quantitativa porque consegue realizar a avaliação do número de moléculas produzidas a cada ciclo. Tal metodologia permite a detecção, quantificação e amplificação de DNA em uma única etapa, agilizando a obtenção de resultados e minimizando o risco decorrente de possíveis contaminações. No presente experimento, as penas dos 91 Marrecos de Pequim

analisadas por PCR em tempo real, apresentaram resultado negativo para a presença de DNA de CAV (figuras 1 e 2). O agente da anemia infecciosa das galinhas já foi previamente pesquisado em diversas espécies, como codornas, patos, gansos e corvos (4). Embora as codornas tenham apresentado anticorpos contra CAV, pode ter havido soroneutralização cruzada com outro agente, de modo que, com tais resultados (de sorologia somente), não é possível afirmar a susceptibilidade desta espécie ao vírus. Os resultados aqui obtidos encontram de acordo com a literatura, não sendo então, comprovada a infecção do CAV em outras aves a não ser na galinha (*Gallus gallus*). Dessa forma a existência de outros hospedeiros para o vírus da anemia infecciosa das galinhas continua desconhecida (5).

CONCLUSÕES

No presente trabalho descrevemos que todas as amostras de penas de Marreco de Pequim obtiveram resultado negativo para anemia infecciosa das galinhas, através da técnica da PCR em tempo real. Assim, até o presente momento, desconhece-se a existência de alguma outra espécie de ave além da galinha comercial (*Gallus gallus*) que possa servir de hospedeiro ao CAV. Tal tipo de resultado é importante, pois, trás a luz da ciência questões relevantes à respeito da epidemiologia de um agente viral sabidamente causador de anemia profunda em galinhas, e extremamente resistente a processos de descontaminação.

REFERÊNCIAS

1. BELLO, N., FRANCINO, O. and Sánchez, A. (2001) Isolation of genomic DNA from feathers. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 13, 162–164.
2. BRENTANO, L., MORES, N., WENTZ, I., CHANDRATILLEKE, D. E SCHAT, K.A. (1991). Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. **Avian Diseases**, 35: 793–800
3. DAVIDSON, I., ARTZI, N., SHKODA, I., LUBLIN, A., LOEBB, E. AND SCHAT, K.A. (2008) The contribution of feathers in the spread of chicken anemia virus. **Virus Research** 132, 152–159.
4. FARKAS, T.; MAEDA, K.; SUGIURA, H.; KAI, K.; HIRAI, K.; OTSUKI, K.;HIRASHI, T. A serological survey of chickens, **Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan**. Vol. 27, nº. 3, pp. 316-320, 1998.
5. FARKAS, T; TODD, D.; MCNULTY, M.S, (2008) **Circoviridae: Poultry Diseases**, editora Elsevier, 6ª ed.cap. 34, pp. 398-404.
6. SCHAT,K,A; **Infectious anemia. Diseases poultry**. 11thed.Ames: Iowa State University,2003.
7. YUASA, N., Taniguchi, T. e Yoshida, I. (1979). Isolation and some characteristics of na agent inducing anemia in chicks. **Avian Diseases**, 23: 366–385.

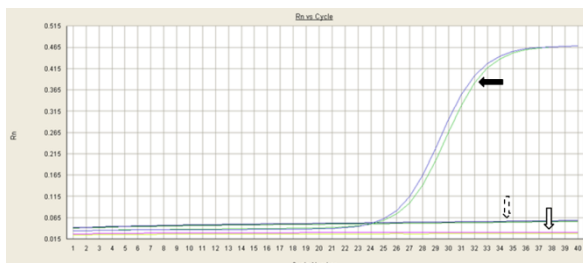


Figura 1. Curva de amplificação obtida na PCR em tempo real para CAV. Seta com preenchimento preto representa a amplificação do controle positivo para CAV, seta sem preenchimento representa a amplificação do controle negativo, seta pontilhada representa a amplificação de uma amostra testada.

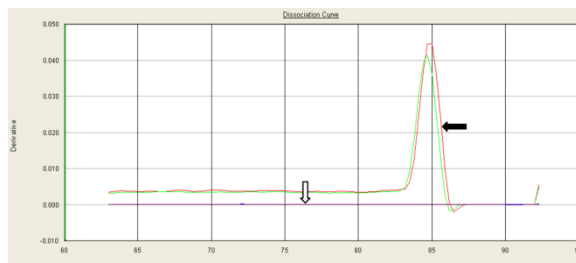


Figura 2. Curva de dissociação obtida na PCR em tempo real para CAV. Seta com preenchimento preto representa a amplificação do controle positivo para CAV. Seta sem preenchimento representa a amplificação do controle negativo e de uma amostra testada.