

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA
ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM FRANGOS DE CORTE
DE CRIAÇÃO DE SUBSISTÊNCIA E INDUSTRIAL NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**

Miguel Angelo Leite Mota Júnior

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO VÍRUS DA
ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS EM FRANGOS DE CORTE
DE CRIAÇÃO DE SUBSISTÊNCIA E INDUSTRIAL NO ESTADO DO
RIO DE JANEIRO**

MIGUEL ANGELO LEITE MOTA JÚNIOR

Sob a Orientação do Professor
Huarrisson Azevedo Santos

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre** em Ciências Veterinárias no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Julho de 2020.

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M917d Mota Junior, Miguel Angelo Leite , 1993-
Detecção e caracterização molecular do vírus da
Anemia Infecciosa das Galinhas em frangos de corte de
criação de subsistência e industrial no Estado do Rio
de Janeiro / Miguel Angelo Leite Mota Junior. -
Piquete, 2020.
59 f.: il.

Orientador: Huarrisson Azevedo Santos.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias , 2020.

1. Anemia Infecciosa das Galinhas. 2. Vírus. 3.
Imunossupressão. 4. Detecção molecular. 5. Análise
filogenética . I. Santos, Huarrisson Azevedo, 1980-,
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 1109 / 2021 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.024961/2021-75

Seropédica-RJ, 13 de abril de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MIGUEL ANGELO LEITE MOTA JUNIOR

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 17/08/2020

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020, tendo em vista a implementação de trabalho remoto e durante a vigência do período de suspensão das atividades acadêmicas presenciais, em virtude das medidas adotadas para reduzir a propagação da pandemia de Covid-19, nas versões finais das teses e dissertações as assinaturas originais dos membros da banca examinadora poderão ser substituídas por documento(s) com assinaturas eletrônicas. Estas devem ser feitas na própria folha de assinaturas, através do SIPAC, ou do Sistema Eletrônico de Informações (SEI) e neste caso a folha com a assinatura deve constar como anexo ao final da tese / dissertação.

(Assinado digitalmente em 13/04/2021 17:06)
HUARRISSON AZEVEDO SANTOS
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: 3701492

(Assinado digitalmente em 13/04/2021 18:01)
PAULO CESAR AUGUSTO DE SOUZA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DESP (12.28.01.00.00.00.52)
Matrícula: 386067

(Assinado digitalmente em 14/04/2021 12:16)
DANIEL DA SILVA GUEDES JUNIOR
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 072.876.757-06

Para verificar a autenticidade deste documento entre em
<https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **1109**, ano:
2021, tipo: **ATA**, data de emissão: **13/04/2021** e o código de verificação: **9d3b7028f4**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer aos meus pais, Miguel Angelo Leite Mota e Maristela Rodrigues Mota, que enfrentaram todas as dificuldades para garantir meus estudos, sempre me remediando nas horas mais difíceis, sendo os dois a minha maior motivação.

A minha irmã, Yasmim Rodrigues Mota, que sempre me ajudou e me apoiou em todos momentos que necessitei, sou eternamente grato por tudo.

Ao meu cunhado, Diego Ferreira, que ao longo dos anos se tornou um irmão para toda vida, só tenho a agradecer por toda convivência e risadas proporcionadas.

Aos meus grandes amigos de infância, Marcela Nishina, Fernando Dourado e Sâmia Reis, por participarem dos momentos mais importantes da minha vida.

A todos meus amigos da UFRRJ, em especial, Camille Sardinha, Jéssica Evangelista, Américo Monteiro, Andressa Alves, Renan Salhab. Danielle Carlos, Gabriel Gonzaga, Josye Franco e Giselle Stefani, que se mostraram sempre presentes durante toda a graduação e pós-graduação.

Queria também agradecer ao Renan Bernardes Tavares, que foi fundamental para minha formação profissional e pessoal, sempre me apoiando e incentivando nas minhas escolhas.

Ao meu orientador, Professor Dr. Huarrisson Azevedo Santos, por todo incentivo e atenção durante meu período de monitoria até o mestrado, sou imensamente grato por todas as oportunidades que foram proporcionadas. E também queria agradecer ao Professor Dr. Paulo César Augusto, por todo aprendizado durante meu período de monitoria na disciplina de Sanidade Avícola.

Ao meu querido amigo, Josemar Gonçalves, por toda ajuda, incentivo e conselhos durante todo meu período no Laboratório de Sanidade Avícola.

Aos amigos do LASAVE, Tays Araujo Camilo, Débora Martins, Patrícia Gonzaga, Thamyris Sampaio, Tamires Resende, Elisa Padua, Leo Paulis, Carolina Van der Meer, Natália Senne, Gabriela Almeida, Brena Gava, So Yin Nak e Gabriel Capucho, por tornarem a vida de laboratório muito mais agradável além de todo conhecimento adquirido.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPQ), pela disponibilização da bolsa por todo período da pós-graduação, e também pelo apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

Todas pessoas listadas acima contribuíram de maneira positiva na minha caminhada, só tenho que agradecer por tudo! Gratidão eterna!

BIOGRAFIA

Miguel Angelo Leite Mota Júnior, filho de Miguel Angelo Leite Mota e Maristela Rodrigues Mota, nascido em 29 de novembro de 1993, no município do Piquete, SP.

Concluiu o ensino médio no ano de 2010 pelo Colégio Objetivo Da Vinci.

Em agosto de 2012 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Medicina Veterinária, tendo concluído o mesmo em 2017.

De março do ano de 2016 a dezembro de 2017 foi monitor da disciplina de Sanidade Avícola do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária da UFRRJ.

Em março de 2018 iniciou o Mestrado no curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Durante todo o período de vida acadêmica, participou de Congressos e Simpósios, participando do grupo de pesquisa.

RESUMO

MOTA-JÚNIOR, Miguel Angelo Leite. **Deteção e caracterização molecular do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas em frangos de corte de criação de subsistência e industrial no Estado do Rio de Janeiro.** 2020. 41p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

A Anemia Infecciosa das Galinhas é uma enfermidade aguda e contagiosa que leva a imunossupressão em aves jovens. Sendo uma doença de grande impacto no setor avícola afetando a taxa de crescimento proporcionando uma grande desuniformidade do lote, além da capacidade de associação do agente etiológico com outras doenças imunossupressoras. O vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG), apresenta um material genético de natureza DNA, constituído por 3 moléculas proteicas que são componentes cruciais para o entendimento do comportamento do vírus. O objetivo deste estudo foi realizar deteção a caracterização molecular do gene VP1 do vAIG a partir de amostras de frangos de corte em granjas industriais e de subsistência do estado do Rio de Janeiro, Brasil. O vAIG foi detectado através da PCR (“*Polymerase Chain Reaction*”) convencional, em diferentes órgãos, como: timo, baço, fígado, tonsila cecal e Bursa de Fabrício. A partir de 60 aves amostradas (30 de granja industrial e 30 de subsistência) foi possível detectar a presença do vAIG em 21,6% (n=13/60). Nas granjas de criação de subsistência observou-se uma frequência de 20% (n=6/30), enquanto nas granjas de criação industrial a frequência foi de 23,33% (n=7/30) (p>0,05). O vírus foi mais frequentemente detectado no timo e no baço (21,6%, n=13/60), tanto em granjas de criação industrial como nas de criação de subsistência. Vale ressaltar que em nenhuma das granjas avaliadas as aves foram vacinadas contra o vAIG. Subsequentemente, duas amostras positivas do sistema de criação de subsistência e duas do sistema industrial foram sequenciadas e comparadas com outras sequências disponíveis no GenBank para o estudo da diversidade genética de estirpes virais. A análise filogenética demonstrou que as amostras 12 e 13 - Criação de Subsistência e as amostras 31 e 36 - Criação de Industrial foram agrupadas em um único clado, o que revela que as cepas são filogeneticamente relacionadas. Os resultados apresentados neste estudo nos permitem concluir que o vAIG circula em granjas de criação industrial e de subsistência no estado do Rio de Janeiro. Contudo, não se pode afirmar que as aves criações de subsistência são fontes de infecção para as granjas industriais. O monitoramento utilizando ferramentas moleculares para deteção do vAIG em granjas industriais é de extrema relevância para a avaliar se os métodos de prevenção estão sendo eficientes para evitar a introdução do vírus.

Palavras-chave: Imunossupressão, Anemia Infecciosa das Galinhas, análise filogenética, Criação Industrial, Criação de Subsistência, *Gallus gallus*

ABSTRACT

MOTA-JÚNIOR, Miguel Angelo Leite. **Detection and molecular characterization of the Chicken Infectious Anemia virus in subsistence and industrial broilers in the State of Rio de Janeiro. 2020.** 41p. Dissertation (Master of Science, Veterinary Science). Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Chicken Infectious Anemia is an acute and contagious disease that leads to immunosuppression in young birds. Being a disease of great impact in the poultry sector, affecting the growth rate, providing a great non-uniformity of the flock, besides the capacity of association of the etiologic agent with other immunosuppressive diseases. The Chicken Infectious Anemia virus (CIAV) has a genetic material of ADN nature, consisting of 3 protein molecules that are crucial components for understanding the behavior of the virus. The objective of this study was to detect the molecular characterization of the CIAV VP1 gene from samples of broilers in industrial and subsistence farms in the state of Rio de Janeiro, Brazil. CIAV was detected using conventional PCR (“Polymerase Chain Reaction”), in different organs, such as: thymus, spleen, liver, cecal tonsil and bursa of Fabricius. From 60 sampled birds (30 from industrial farm and 30 from subsistence) it was possible to detect the presence of CIAV in 21.6% (n = 13/60). In livestock farms, a frequency of 20% (n = 6/30) was observed, while in industrial farms the frequency was 23.33% (n = 7/30) (p> 0.05). The virus was most frequently detected in the thymus and spleen (21.6%, n = 13/60), both in industrial and livestock farms. It is worth mentioning that in none of the evaluated farms the birds were vaccinated against CIAV. Subsequently, two positive samples from the livelihood system and two from the industrial system were sequenced and compared with other sequences available from GenBank to study the genetic diversity of viral strains. Phylogenetic analysis showed that samples 12 and 13 - Subsistence Creation and samples 31 and 36 - Industrial Creation were grouped into a single clade, which reveals that the strains are phylogenetically related. The results presented in this study allow us to conclude that CIAV circulates in farms of industrial creation and subsistence in the state of Rio de Janeiro. However, it cannot be said that livestock livestock are sources of infection for industrial farms. Monitoring using molecular tools for the detection of CIAV in industrial farms is extremely important to assess whether prevention methods are being effective in preventing the introduction of the virus.

Keywords: Immunosuppression, Chicken Infectious Anemia, phylogenetic analysis, Industrial Breeding, Subsistence Breeding, *Gallus gallus*.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Informações das aves coletadas oriundas de criação de subsistência e industrial do Estado do Rio de Janeiro. 18
- Tabela 2** - Primers utilizados na detecção molecular do vAIG em amostras oriundas de granjas de criação de subsistência e industrial do Estado do Rio de Janeiro. 20
- Tabela 3** - Estirpes do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG) disponíveis no banco de dados GenBank utilizadas para comparação das estirpes isoladas no projeto. 22
- Tabela 4** - Frequência de amostras positivas para o Vírus da Anemia Infecciosa as Galinhas detectados através da PCR em granjas de sistema de criação de subsistência e industrial localizadas no Estado do Rio de Janeiro. 25
- Tabela 5**. Amostras de órgãos de aves positivas para o Vírus da Anemia Infecciosa as Galinhas, que foram detectados através da PCR em granjas de sistema de criação de subsistência e industrial localizadas no Estado do Rio de Janeiro. 30

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem representando o genoma do vAIG. O vAIG codifica um único transcrito, sendo constituído por 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.5
- Figura 2** - Distribuição dos locais de coletas ondem foram realizadas amostragem de frangos de corte criados em sistema industrial e de subsistência. O mapa foi elaborado através do Software Quantum GIS (QGIS).16
- Figura 3** - Aves oriundas das propriedades D e E de criação de subsistência utilizadas no estudo. (Fonte: Arquivo pessoal)17
- Figura 4** - Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos obtidos através do teste de limite mínimo de detecção do Primer F1/R1 de 843pb. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 1KB (Invitrogen); Linhas 2 e 3: diluições amplificadas; Linhas 4,5,6 e 7: diluições não amplificadas.....23
- Figura 5** - Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos obtidos através do teste de limite mínimo de detecção do Primer F2/R2 de 989pb. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 1KB (Invitrogen); Linhas 3,4 e 5: diluições amplificadas; Linhas 6, 7 e 8: diluições não amplificadas.....24
- Figura 6** - Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos obtidos através do teste de limite mínimo de detecção do Primer F3/R3 de 802pb. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 1KB (Invitrogen); Linhas 2 e 3: diluições amplificadas; Linhas 4,5 6 e 7: diluições não amplificadas.....24
- Figura 7** - Comparação do número total de animais positivos para o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas entre sistema de criação de subsistência e industrial através da técnica de PCR26
- Figura 8** - Comparação do número total de aves positivas pela técnica de PCR entre os órgãos coletados em granjas de criação industrial e de subsistência para detecção do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas.....30

Figura 9 - Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos da PCR amplificados com 989pb do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 100bp (Invitrogen); Linha 2,4,6,8,9,10: amostras positivas; Linhas 2, 3, 5 e 7: amostras negativas; Linha 13 e 14: Controle negativo e Linha 16: Controle positivo. (Propriedade G)31

Figura 10 - Comparação par-a-par do Percentual de Identidade (diagonal inferior) e da distância (diagonal superior) de um fragmento de 588 pares de base do gene *vp1* do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG) de amostras timo de frangos de corte criados no sistema industrial e de subsistência no estado do Rio de Janeiro com amostras de diversos estados do Brasil. A sequência AY633926 foi utilizada como sequência de referência por ser a mais antiga depositada no Genbank.....34

Figura 11 - Alinhamento local de aminoácidos de um fragmento parcial da proteína VP1 do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG), obtidas de frangos de corte de criação industrial e de subsistência no estado do Rio de Janeiro com outras sequências da proteína VP1 do vAIG de diversos estados do Brasil. A sequência de peptídeo AAT47125 oriunda de frangos de corte do estado de São Paulo foi utilizado como referência por ser a mais atinga depositada no Genbank.....35

Figura 12 - Alinhamento local de aminoácidos de um fragmento parcial da proteína VP1 do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG), obtidas de frangos de corte de criação industrial e de subsistência no estado do Rio de Janeiro com outras sequências da proteína VP1 do vAIG de diversos estados do Brasil. A sequência de peptídeo AAT47125 oriunda de frangos de corte do estado de São Paulo foi utilizado como referência por ser a mais atinga depositada no Genbank.....36

Figura 13 - Gráfico de entropia obtida através do alinhamento de sequência de peptídeos da proteína VP1 do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas de amostras brasileiras37

Figura 14 - Relação evolutiva foi inferida através do Maximum Likelihood Estimation. Próximo aos braços da árvore, a porcentagem da associação dos táxons que agruparam é demonstrada pelo valor de *bootstrap* (1000 pseudoréplicas). A distância evolutiva foi computada pelo método Kimura-2-parâmetros com G + I. A análise envolveu 54 sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank de diversas partes do mundo. Todas as posições contendo *gaps* e dados omissos foram eliminados. A análise evolutiva foi realizada através do MEGA X.....39

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Cenário da avicultura.....	3
2.2 Histórico da doença	3
2.3 Etiologia	4
2.4 Resistência do agente.....	6
2.5 Epidemiologia.....	6
2.6 Patogenia	8
2.7 Sinais clínicos	8
2.8 Lesões macroscópicas.....	9
2.9 Lesões microscópica.....	10
2.10 Diagnóstico	11
2.11 Análise molecular do vAIG.....	13
2.12 Prevenção e controle.....	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Locais de estudos e coletas	15
3.2 Coleta de amostras.....	16
3.3 Extração do DNA total	18
3.4 Controle positivo das reações de PCR.....	19
3.5 Detecção molecular do vAIG através da PCR.....	19
3.6 Primers utilizados no experimento	20
3.7 Limite mínimo de detecção	20
3.8 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento	21
3.9 Análise e alinhamento das sequências do vAIG.....	21
3.10 Análises filogenéticas	22
3.11 Análise estatística	23
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
4.1 Limite mínimo de detecção	23
4.2 Detecção molecular do vAIG através da PCR.....	25
4.3 Análise e alinhamento das sequências do vAIG.....	31
4.4 Análises filogenéticas	38
5 CONCLUSÕES.....	40
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A Anemia Infecciosa das Galinhas (AIG) é uma doença viral, aguda e contagiosa que leva a imunossupressão em aves jovens. Sendo de grande impacto no setor avícola acometendo principalmente criações comerciais de frango de corte. Sendo descrita inicialmente no Japão por Yusa et al. (1979) sendo distribuída de forma ampla em todos países produtores no setor avícola. O vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG) causa uma doença denominada de “asa azul” nas galinhas, anemia infecciosa, síndrome hemorrágica ou síndrome da dermatite. Os sinais clínicos aparecem somente em aves jovens que apresentam o sistema imune imaturo, tornando-se susceptível a doença clínica.

As galinhas são as únicas espécies hospedeiras do vAIG (SCHAT et al., 2003; FARKAS et al., 2008), não apresentando qualquer descrição da ocorrência em seres humanos e outros animais. A transmissibilidade do vAIG pode ocorrer duas formas: na forma horizontal e vertical. A forma horizontal ocorre a partir do contato direto e indireto entre as aves, através da via respiratória, via oral e fezes contaminadas. A forma vertical é uma das principais vias de transmissão do vírus, através de reprodutoras que infectam suas progênes (HOOP et al., 1992).

O diagnóstico da Anemia Infecciosa das galinhas é difícil quando baseado somente na sintomatologia clínica e lesões. A semelhança das lesões com as causadas por outras doenças no que se diz respeito as alterações encontradas, não são suficientes para fechar o diagnóstico dessa doença. O diagnóstico confirmatório requer isolamento e identificação do vAIG. Por esta razão, as ferramentas de detecção viral mais utilizadas são realizadas por meio do isolamento viral, visualização e detecção dos anticorpos e detecção de fragmentos do genoma do vírus. A técnica de ELISA é a principal ferramenta sorológica comumente utilizada em lotes não vacinados por sua rapidez e capacidade de realizar testes em grandes quantidades de amostras de soro. Esses testes sorológicos indica somente a exposição ao vírus e não infecção atual, e por esse motivo são mais indicados na monitoria da presença e níveis de imunidade nos lotes e mais dificilmente tem valor diagnostico de doença (SCHAT et al., 2003).

A análise molecular apresenta diversas técnicas importantes que são comumente utilizadas para o diagnóstico do vAIG, dentre elas, destaca-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), no qual possibilita a identificação e caracterização dos principais genes do vAIG, de forma rapida e com poucos gastos. Existem inúmeros protocolos de PCR que utilizam fragmentos de órgãos, soro de galinhas ou cultivo de células, para detecção do DNA viral (CARDONA et al., 2000; YILMAZ et al., 2001). Associado a técnica de PCR, o sequenciamento do DNA viral podem

reunir e organizar informações importantes para a epidemiologia e a evolução e desenvolvimento de microorganismos, no que se tornou uma técnica de rápida e de fácil execução (THAM E STANISLAWEK, 1992; DUCATEZ ET AL., 2006; BARRIOS et al., 2009).

Dentre as três proteínas virais constituintes do genoma do vAIG, temos a proteína VP1, sendo um componente estrutural do vírus, constituindo o capsídeo viral, que apresenta na sua região C- terminal, fatores associados ao mecanismo de replicação do DNA viral por círculo rolante. Ao longo dos anos, se tornou alvo de diversos estudos, devido ao fato de possuir grande variabilidade genética, sendo muito utilizado na caracterização do vírus em estudos moleculares. (KOCH et al., 1995; BRENTANO et al., 2000).

O controle da anemia infecciosa das galinhas é baseado na transferência de imunidade passiva das matrizes para a progênie, assegurando que as reprodutoras desenvolvam anticorpos ao vAIG antes do início da postura, evitando que a transmissão vertical ocorra e ao mesmo tempo promova a transferência de anticorpos maternos protetores para a progênie. Estratégias de vacinação, com vírus vivo atenuado ou vacinas recombinante estão sendo exploradas (DHAMA et al., 2002). Um método importante para o controle e prevenção da doença se baseiam no monitoramento sorológico para evitar a ocorrência de surtos e contaminações de vacina, além das boas práticas de biossegurança que auxiliam na redução da exposição ao vírus (FUSSEL, 1998).

O objetivo do presente estudo foi realizar a detecção do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas através da PCR em amostras de órgãos linfoides, tais como: timo, baço, fígado, tonsila cecal e bursa de fabricius em frangos de corte oriundos de granjas industriais e de subsistência localizadas na região Sul fluminense do estado do Rio de Janeiro. Em seguida as amostras positivas foram purificadas e sequenciadas para determinar a variabilidade genética do gene VP1 e realizar a caracterização molecular do vAIG por meio de análise filogenética, e verificar se genótipos virais semelhantes circulam entre os sistemas de criações avaliados neste estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cenário econômico da avicultura no Brasil

Na atualidade, a avicultura brasileira assume posição relevante no cenário mundial. Em 2018, o Brasil liderou o ranking mundial, sendo reconhecido como maior exportador mundial, tendo 4.21 milhões de toneladas exportadas de carne de frango, sendo também reconhecido como o segundo maior produtor com 13.2 milhões de toneladas geradas (ABPA, 2020). É possível afirmar que o alto consumo da carne de frango está associado ao preço economicamente mais viável, principalmente, quando comparado às demais proteínas animais.

Outro fato que justifica a relevância da posição do país como exportador é que esse tipo de proteína animal não é alvo de restrições religiosas e possui ótimas características nutricionais, fatores que a tornam um atrativo no mercado (RUTZ et al, 2011).

As enfermidades que acometem as aves de produção têm causado impactos negativos na produtividade e que reduz a lucratividade do setor avícola. Várias dessas doenças apareceram como resultado do desenvolvimento tecnológico e genético sendo necessária a utilização de todos avanços tecnológicos adquiridos além de medicina preventiva para combatê-las.

Dentre elas, destaca-se a Anemia Infecciosa das Galinhas, sendo uma das doenças virais mais importantes em frangos de corte levando a um quadro de anemia, aplasia de medula óssea, atrofia de órgãos linfóides e redução de peso em frangos (YUASA et al., 1979; LUCIO et.al., 1990), com conseqüente aparecimento de infecções secundárias e oportunistas (BULOW e SCHAT, 1997) bem como baixas respostas imunes vacinais a determinadas doenças (OTAKI et al., 1988; BOX et al., 1988; De BOER et al., 1994).

2.2 Histórico da doença

No ano de 1979, Yuasa descreveu um isolamento no Japão que envolvia um agente filtrável e transmissível em pintos livres de patógenos específicos (SPF) de um dia de idade, que foram inoculados com material de campo, denominados “Chicken Anemia Agent” (CAA). Tal situação causou nas aves uma doença com sintomas caracterizados por anemia associada a aplasia da medula óssea, acompanhada de hemorragias subcutâneas e intramusculares. Assim, identificou-se que tal doença se apresentava como uma patologia de caráter imunossupressor em aves.

Na Suécia tal enfermidade já era conhecida desde 1972 e, na época, popularmente chamada de “doença da asa azul”. (ENGSTRON e LUTHMAN, 1984). Nos anos 80 foram

registrados publicamente diversos e intensos surtos de dermatite gangrenosa verificada em conjunto com a anemia aplásica com incidência direta na indústria de frango na Alemanha (BULLOW et al., 1997).

No Brasil, a doença foi observada nos Estados do Sul e Sudeste do Brasil, em aves comerciais destinadas para o corte, onde demonstravam sinais clínicos sugestivos da Anemia Infecciosa das Galinhas, tais como, lotes de três a seis semanas de idade com histórico de grande desuniformidade de carcaças, medula óssea rósea a amarelada (aplasia de médula) e vários graus de atrofia de timo. Podendo propiciar perdas econômicas consideráveis devido a condenação de carcaça provenientes de hemorragias musculares associadas ou não a dermatite. A partir disto, foi desenvolvida uma metodologia para isolamento e identificação sorológica através da técnica de ELISA, utilizando anticorpos monoclonais específicos, levando a descrição dos primeiros relatos do vAIG no Brasil (BRENTANO et al., 2000).

2.3 Etiologia

O vAIG pertence à família *Anelloviridae* (ROSARIO et al., 2017) sendo classificado no gênero *Gyrovirus* (PRINGLE, 1999). É um vírus não-envelopado, com capsídeo de simetria icosaédrica, medindo cerca de 23 a 25nm de diâmetro, sendo considerado um dos menores vírus de aves conhecidos, caracterizado por conter genoma DNA com formato circular de fita simples negativa apresentando cerca de 2kb (GELDERBLOM et al., 1989; MC NULTY et al., 1989; NOTEBORN et al., 1991).

O genoma viral é constituído por cinco regiões não transcritas que apresentam uma atividade promotora e três ORFs (“open reading frames”) sobrepostas que são transcritas como uma cadeia simples de mRNA, onde três proteínas virais distintas são traduzidas utilizando proteína de tradução (NOTEBORN et al., 1991; PHENIX et al., 1994). Dentre as proteínas codificadas pelo genoma, tem-se a VP1, codificada pela ORF1, é a maior proteína com aproximadamente 52 kDa de tamanho molecular, desempenhando um papel funcional na replicação viral, sendo um componente estrutural do vírus, ou seja, atuando na encapsidação do vírus (CROWTHER et al., 2003; ; LIEN et al., 2012).

Temos também a proteína VP2, codificada pela ORF2, apresentando 24 kDa de tamanho molecular, sendo uma proteína fosfatase de dupla especificidade, atuando em catalisar e remover o fosfato e substratos existentes. As proteínas fosfatases atuam diretamente na regulação da mitogênese, transcrição gênica, interações celulares, na diferenciação celular e nas respostas

das citocinas de linfócitos (ONG et al., 1997). Exercendo também um importante papel na fase de replicação viral do agente (TODD et al., 1990). As duas proteínas apresentam a capacidade de induzir anticorpos neutralizantes (KOCH et al., 1995).

A proteína VP3, denominada de apoptina (ZHUANG et al., 1995), codificada pela ORF3, apresenta aproximadamente 13 kDa de tamanho molecular. Na infecção de células mononucleares, a proteína VP3 se dissemina na porção intranuclear granular, e também em partes no citoplasma. Nos estágios avançados da infecção, ocorre a formação de agregados nucleares, onde a célula se torna apoptótica e o DNA celular é fragmentado e condensado (NOTEBORN et al., 1994). Sendo assim, capaz de causar a morte celular programada de precursores de linfócitos T infectados no timo e hemocitoblastos na medula óssea (NOTEBORN et al., 1994; JEURISSEN., et al 1992; SANTOS et al., 2012).

Estudos realizados por Noteborn (2004) relata o papel importante da proteína VP2 juntamente com a VP3, quando se trata da patogenicidade do vírus sobre o hospedeiro, indicando que a proteína VP2 seria capaz de causar apoptose celular, porém em menor atuação. A partir disto, Peters (2006) sugeriu que as mutações em VP2 podem alterar o tráfico de VP3 para o núcleo na célula infectada, fazendo com o que ocorra a regulação do estado de fosforilação da proteína VP3, sendo capaz de ativar e induzir a apoptose celular.

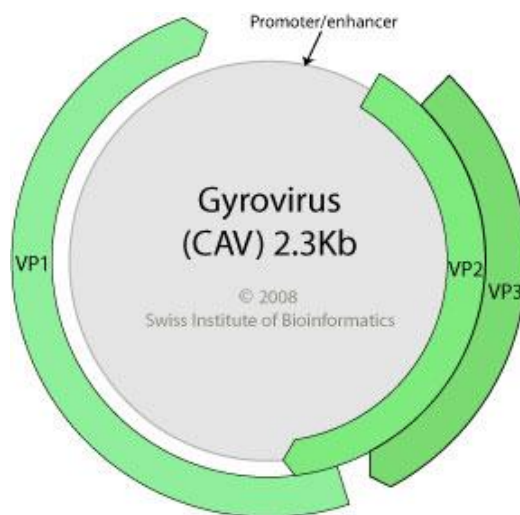


Figura 1: Imagem representando o genoma do vAIG. O vAIG codifica um único transcrito, sendo constituído por três ORFs com sobreposição parcial, que codificam as três proteínas virais (VP1, VP2 e VP3) e uma região não transcrita que compreende a região promotora. **Fonte:** (Adaptado de Todd et al., 2000).

2.4 Resistência do agente

Tratando-se do fator de resistência do agente, o vAIG apresenta grande resistência a diversos compostos químicos, sendo estes: éter, clorofórmio, acetona a 90% por 24 horas, fenol a 5%, desinfetantes a base de ortodichlorobenzene e detergentes quaternários de amônio 5% e pH 3 por 3 horas (McNULTY et al., 1991; ALLAN et al., 1994; BULLOW e SCHAT., 1997).

Em contrapartida, o vAIG é inativado através da utilização de fenol a 50% por 5 minutos, além de iodo e hipoclorito de sódio em concentrações no mínimo de 10% por duas horas a 37°C, sendo completamente inativado em temperatura de 100°C por 15 minutos (GORYO et al., 1985).

De certa forma, a alta resistência do vAIG no ambiente leva a grandes impactos no que diz respeito aos aspectos epidemiológicos, quanto no aspecto econômicos, a partir do momento em que se torna necessário um gasto exacerbado de altas concentrações de agentes químicos visando um controle de forma eficiente do vAIG nos ambientes avícolas (BRENTANO et al., 2000; TODD et al., 2000).

2.5 Epidemiologia

As galinhas são conhecidas como únicos hospedeiros naturais do vAIG (POPE, 1991; TODD, 2004; FARKAS et al., 2008). No Reino Unido, foram realizados estudos sorológicos em perus a partir da inoculação experimental do vAIG, através da via intramuscular, onde esta espécie não manifestou quaisquer sinais clínicos da doença, além disto, também não foi detectada a presença de anticorpos frente a exposição ao vAIG (McNULTY et al., 1988). No Japão também foram realizados estudos em espécies de aves como codornas, patos, gansos e corvos, onde somente a codorna apresentou anticorpos do vAIG, não sendo possível afirmar a susceptibilidade desta espécie ao vAIG (FARKAS et al., 1998). Estudos realizados na China, mostraram que variantes do vAIG foram detectadas a partir de amostras de fezes de gatos errantes e humanos (ZHANG et al., 2012; 2014). Porém, não existem evidências que o vAIG seja capaz de causar a doença no homem, não gerando riscos à saúde pública e alimentar (SCHAT et al., 2003).

A transmissibilidade do vAIG pode ocorrer tanto na forma vertical quanto na forma horizontal. A forma vertical é a principal forma de transmissão da doença, sendo uma via que propicia a propagação do vAIG de matrizes infectadas para as gerações de progênes, ocorrendo em aves infectadas tanto soronegativas quanto na presença de altos níveis de anticorpos neutralizantes. (BRENTANO et al., 1990; HOOP et al., 1992; HOOP et al., 1993).

Na transmissão horizontal, a principal via de infecção é a fecal-oral, visto que aves infectadas excretam o vAIG nas fezes por um período de 2 semanas, podendo se estender até 5 semanas, onde posteriormente aves sadias presentes no mesmo ambiente são infectadas através da ingestão de material contaminado com fezes infectadas ou através do contato com fômites contaminados. Temos também através da via sêmen, onde galos são capazes de transmitir o vAIG até o momento em que desenvolvam anticorpos contra o agente (HOOP et al., 1992; HOOP et al., 1993). Além destas vias mencionadas dentro da forma horizontal, podemos destacar também, que através de um estudo realizado, foi observada a transmissibilidade do vAIG pela via trato respiratório em aves que haviam sido infectadas experimentalmente (ROSENBERGER et al., 1989).

Compreende-se que o período de incubação do vAIG pode variar entre 10 a 21 dias, estando relacionado ao período de infecção inicial e consequente manifestações dos sinais clínicos e lesões. Alguns fatores influenciam no período de incubação, sendo estes, quantidade de carga viral infectante, condições de manejos, doenças associadas e patogenia da amostra viral circulante (SCHAT et al., 2003; FLORES et al., 2007).

A doença é caracterizada por apresentar uma taxa de mortalidade bastante variável, que oscila entre 2% a 20%, que depende de acordo com o grau de severidade da doença, e apresenta uma taxa de morbidade de 100% (GORYO et al., 1987; SCHAT et al., 2003). A susceptibilidade entre as aves nos primeiros dias da vida é maior frente a infecção pelo vAIG, quando comparada com aves após 2 semanas de vida. Sendo assim, aves nos primeiros dias de vida que consequentemente são infectadas pelo vAIG, apresentam a forma clínica da doença. Em contrapartida, aves com uma idade igual ou superior a 2 semanas de vida, quando infectadas, raramente vão apresentar a doença clínica (YUASA et al., 1983).

Vale ressaltar que pelo fato do vAIG acarretar o comprometimento do sistema imune das aves, consequentemente propicia a predisposição a infecções oportunistas e secundárias por bactérias e fungos. A imunossupressão do vAIG também está diretamente relacionada aos inadequados níveis de respostas imunes vacinais e aumento de patogenia de outras infecções concomitantes (ADAIR et al., 1993). Diversos estudos relatam a ocorrência do vAIG associado com outras doenças presentes no setor avícola, tais como Doença de Marek (OTAKI et al., 1988), Doença de Newcastle (BOX et al., 1988), Reovírus (McNEILLY et al., 1995), Doença de Gumboro e Bronquite Infeciosa (TORO et al., 2006). Dentre essas informações, nota-se que o vAIG vem aumentando sua prevalência cada vez mais, e sua infecção consequentemente

aumenta a suscetibilidade a uma grande variedade de outros patógenos, gerando grandes prejuízos para os planteis avícolas que são acometidos.

2.6 Patogenia

Inicialmente, o vAIG necessita de células em divisão para se replicar, infectando células mieloides progenitoras na medula óssea, linfócitos T precursores e timócitos mais maduros presentes no córtex do timo, células T imaturas e células mononucleares do baço. No baço, além de afetar esses componentes, o vAIG pode infectar também células que apresentam características de linfócitos T citotóxicos, que expressam os receptores CD8 e TCRab. O vAIG não infecta macrófagos, porém, a doença propicia alteração na função de macrófagos possivelmente devido a infecção em outras células que influencia a expressão de diversas citocinas (SCHAT, 2003; MILLER e SCHAT, 2004).

O vAIG causa apoptose de timócitos e hemocitoblastos (NOTEBORN et al., 1994; JEURISSEN., et al 1992), que são células de suma importância no que se diz respeito no desenvolvimento da imunidade da ave. A redução de hemocitoblastos pela morte celular programada por ação do vAIG conseqüentemente irá propiciar a redução de eritrócitos, trombócitos que são necessários a geração de células do sistema de coagulação e de granulócitos precursores de células de respostas inflamatórias. A apoptose dessas células ocasionará em aplasia da medula óssea, anemia, hemorragias e baixa resposta contra infecções secundárias (SCHAT, 2003).

A redução dos trombócitos devido atuação do vAIG pode acarretar também no aumento de ocorrência de infecções secundárias, pois, além de serem essenciais na coagulação, os trombócitos também atuam na fagocitose em aves, sendo capazes de secretar diversas citocinas e enzimas necessárias para dar início as respostas inflamatórias. Além disso, a redução de hemocitoblastos e timócitos acarretará consideravelmente na capacidade de imunidade das aves, pois ambas são importantes tanto para imunidade inata quanto para imunidade adquirida. (SCHAT, 2003; MILLER e SCHAT, 2004).

2.7 Sinais clínicos

Aves de todas as idades são predispostas ao vírus, sendo a doença clínica de manifestação com maior gravidade em aves de duas semanas de idade, desenvolvendo lesões ou viremia persistente. As aves adultas produzem anticorpos contra o vírus, diminuindo as chances de doença clínica, o que não impede a infecção vertical à prole, apresentando forma

mais comum de transmissão do vírus (YUASA et al., 1983; MILLER e SCHAT, 2004; TODD., et al 2004).

Aves de lotes infectados apresentam desenvolvimento corporal lento, apatia, palidez, perda de peso, anorexia, depressão e severa anemia (valores mínimos no hematócrito entre 6 a 7%, sendo que o normal é aquele maior que 27%), esfregaços de sangue frequentemente revelam anemia, leucopenia e pancitopenia dependendo do estágio da doença. Além disso também podem apresentar plumagens arrepiadas, severas infecções epiteliais, hemorragias subcutâneas e musculares, lesões de pele, na cabeça, lateralmente a região torácica, abdômen, patas e coxa e as asas geralmente se apresentam azuladas deixando sair um tipo de exsudato sanguinolento decorrente de infecções bacterianas secundárias. (MILES et al., 2001; SCHAT e VAN SANTEN, 2008).

Em casos em que as aves sobrevivem a doença, estas se recuperam da depressão e anemia, porém o peso vivo se mantém baixo. São características da infecção por vAIG a redução do ganho de peso e do hematócrito entre 12 a 20 dias após a infecção (GORYO et al., 1989). A mortalidade normalmente em aves jovens se dá entre 12 a 28 dias de idade, com taxa de mortalidade em média de 10%, podendo ser superior a 50% em casos de associações a outras doenças concomitantes (FEHLER et al., 1998; DAVIDSON et al., 2004).

2.8 Lesões macroscópicas

As principais lesões macroscópicas em aves acometidas pelo vAIG são: medula óssea atrofiada, timo, baço e bolsa cloacal de tamanho reduzido, hemorragias na região do proventrículo. Conforme a gravidade da doença é possível observar ainda rins e fígado com coloração esbranquiçada (TODD., et al 2002). Dermatite gangrenosa e extensas hemorragias no subcutâneo e músculos também são lesões encontradas resultante desta enfermidade, assim como lesões distribuídas em áreas distintas do corpo (REVOLLEDO et. al., 2009). Quando associada a infecções por outros patógenos, as lesões podem se agravar ainda mais, ocasionado o aparecimento de exsudato sanguinolento (TODD et al., 2002).

Nas lesões macroscópicas pode ser observado a inexistência dos lobos do timo, medula óssea de coloração rosada ou amarelada e ocasionalmente a atrofia da Bursa. Em virtude da infecção na medula óssea, na microscopia se encontra depleção de eritrócitos, trombócitos e granulócitos e seus percussores, atrofia do timo, Bursa de Fabricius e baço. Os compartimentos hematopoiéticos em sua totalidade estão propensos a atrofia e aplasia podendo ocorrer a

substituição de células hematopoiéticas por células adiposas (ROSEMBERGER e CLOUD, 1998).

2.9 Lesões microscópicas

As lesões microscópicas encontradas nas aves infectadas naturalmente provocam no timo severa depleção, degeneração hidrópica redução dos centros germinativos, proliferação de células reticulares, decréscimo na quantidade de linfócitos e focos necróticos (BRENTANO, et al 2009; SCHAT e VAN SANTEN, 2008). A bolsa cloacal afetada apresenta atrofia de folículos linfóides, focos necróticos, crescimento de tecido interfolicular e células linfóides com núcleos picnóticos e vacúolos no citoplasma.

Tais lesões costumam ser confundidas com as causadas pelo vírus da Doença Infecciosa Bursal (DIB), de acordo com o estágio da infecção (SCHAT e VAN SANTEN, 2008). Já na medula óssea a aplasia e atrofia cingem todos os compartimentos e atingem todas as linhagens hematopoiéticas. Pequenos focos necróticos também podem ser encontrados. As células hematopoiéticas são substituídas por tecido gorduroso e proliferação do estroma celular justificando a aparência amarelada da medula na observação da lesão macroscópica. No baço se nota depleção de linfócitos T com hiperplasia de células reticulares. O fígado, rins, pulmões, proventrículo duodeno e tonsilas cecais apresentam depleção de focos linfóides. Ocasionalmente o fígado pode desenvolver aumento e dilatação dos sinusóides hepáticos. Pequenas inclusões eosinofílicas nucleares foram encontradas em células infectadas predominantemente no timo e medula óssea e foram mais observadas nos 5-7 dias após inoculação experimental (GORYO et al., 1989; SMYTH et al., 1993).

2.10 Diagnóstico

Inicialmente, para realização do diagnóstico do vAIG, deve-se realizar a observação do histórico, sinais clínicos e lesões patológicas que este lote analisado estejam apresentando, como forma de diagnóstico sugestivo da AIG, sendo extremamente necessário associar com diagnósticos confirmatórios através de provas laboratoriais, visto que não pode se finalizar o diagnóstico somente através do diagnóstico presuntivo, pois outras patologias podem apresentar as mesmas características observadas, podendo gerar confusões no posterior diagnóstico (McNULTY et al., 1998; SCHAT et al., 2003). As técnicas laboratoriais empregadas visam a detecção de antígenos ou ácidos nucleicos do vAIG (CIACCI-ZANELLA e BRENTANO, 2012).

O isolamento viral é uma das técnicas utilizadas para detecção do vAIG, o principal órgão de predileção para isolamento do vAIG é o fígado, porém podem ser isolados a partir da pele, do baço, do timo, dos pulmões, do coração, da bolsa, dos músculos, das fezes e da medula óssea. O vAIG também podem ser isolados a partir de células MDCC-CU147, que se caracterizam em apresentar uma maior capacidade de isolamento do vAIG quando comparada com outras linhagens celulares (CALNEK et al., 2000), além deste, o vAIG também pode ser isolado a partir de células MDCC-MSB1, que são células linfoblastóides provenientes de tumores originados por ação do vírus da doença de Marek, que através do efeito citopático nas células acarretam em alterações que levam a morte celular. Além de órgãos e linhagens celulares, o vAIG pode ser isolado também através da passagem de fígados de aves infectadas a pintos SPF (“*Specific Pathogen Free*”) de 1 dia de idade e ovos embrionados com cinco dias de incubação (YUASA e IMAI, 1986; McNULTY et al., 1990; BRENTANO et al., 1991; CIACCI-ZANELLA e BRENTANO, 2012). Atualmente, a técnica de isolamento viral costuma ser utilizada para fins de pesquisa, e não é mais recomendada para diagnóstico, devido ao elevado custo para execução da técnica, além do tempo para conclusão da análise ser relativamente maior quando comparado as demais técnicas (CIACCI-ZANELLA e BRENTANO, 2012).

As análises sorológicas são constituídas de técnicas que indicam a exposição das aves frente ao vAIG, através da detecção os anticorpos produzidos em resposta à infecção. Dentre as principais técnicas sorológicas, podemos destacar a imunofluorescência indireta (IFA), imunoperoxidase (IP), soroneutralização (SN) em cultivo celular e ELISA (SCHAT et al., 2003). As técnicas de IFA, IP e SN são técnicas de custo elevado, que exigem uma adequada estrutura laboratorial de cultivo celular e experiência para interpretação corretas dos resultados, além de exigir um tempo maior para conclusão da análise, portanto, não são comumente utilizadas, sendo assim, uma técnica sorológica bem inserida na avicultura para detecção de anticorpos do vAIG, é o teste de ELISA (TODD et al., 1990; MARKOWSKI-GRIMSRUD et al., 2002; NOGUEIRA-DANTAS et al., 2007; CIACCI-ZANELLA e BRENTANO, 2012). Os testes sorológicos em questão indicam somente a pré-exposição ao vírus e não infecção atual, e por esse motivo é mais utilizado em investigação epidemiológica, monitoramento vacinal e de exposição a vírus de campo em lotes não vacinados (TODD et al., 2000; SCHAT et al., 2003; DHAMA et al., 2008).

A Imuno-histoquímica (IHQ) também é uma técnica que pode ser utilizada para o diagnóstico de vAIG, sendo uma técnica cuja principal função é de localizar a presença de antígenos diretamente em tecidos congelados, ou também através de órgãos em soluções de fixação. A sensibilidade do diagnóstico do vAIG em tecidos através da IHQ pode ser bastante variável, ou seja, que depende especificamente do período de coleta do material, devendo ser realizada entre 6 a 10 dias após infecção para detecção do antígeno viral nas células, visto que a partir do momento que ocorre o aparecimento de lesões, posteriormente ocorre a redução de antígenos virais presentes no tecido analisado, tornando-se necessário analisar diferentes aves com níveis variados de lesões indicativas de AIG, para assim ter uma amostragem de diferentes fases de infecção (BRENTANO et al., 2009).

O diagnóstico molecular é uma das principais ferramentas comumente utilizadas na avicultura, que se caracteriza pela aplicação de técnicas de moleculares, que utilizam primers específicos do vAIG, com a finalidade de detectar rapidamente e de forma específica através da amplificação do vAIG presente em amostras de órgãos e soros de aves infectadas, ou através do genoma do vírus isolado em cultivos celulares (TODD et al., 1992; THAM e STANISLAWEK et al., 1992; SOINÉ et al., 1993; BRENTANO et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2005). As principais vantagens da utilização de técnicas moleculares na avicultura estão relacionadas devido apresentarem alta eficiência, rapidez, segurança dos resultados e a capacidade de detectar agentes de difícil cultivo ou de crescimento muito lento, permitindo

dessa forma, um diagnóstico mais consistente em menos tempo, agilizando o plano de tratamento inicial e trazendo maiores probabilidades de recuperação em tempo reduzido, apresentando inúmeros benefícios quando comparado com as demais técnicas de diagnóstico utilizadas rotineiramente para o vAIG.. (DEACON et al., 1989).

2.11 Análise molecular do vAIG

Diversos trabalhos apresentam o desenvolvimento de inúmeras técnicas de detecção molecular do vAIG através de “Polymerase Chain Reaction” (PCR), Hibridização “*in situ*”, “Quantitative Polymerase Chain Reaction” (qPCR), nested-PCR (nPCR) e Multiplex PCR.

No laboratório da Embrapa em Concórdia/SC, foi desenvolvida uma PCR utilizando primers específicos para amplificação de 714 nucleotídeos que codificam o gene para proteína VP3 e parte da proteína VP1, onde esta técnica demonstrou capacidade de detecção do vAIG em órgãos como timo, fígado, baço e bursas oriundas de materiais coletados de campo, além de aves que foram inoculadas experimentalmente com amostras infectadas com vAIG, sendo possível correlacionar com a sensibilidade dos resultados positivos de isolamento viral *in vivo* (BRENTANO et al., 2000; NOGUEIRA et al., 2005).

No ano de 2005, foi estabelecido um protocolo de nPCR para detecção do vAIG, a partir de amostras de órgãos, soros e camas aviárias oriundas de lotes com e sem sinais clínicos sugestivos de vAIG. Inicialmente, foi utilizado um primeiro par de primer para amplificação de 664 nucleotídeos que compreendem a porção do gene para proteína VP1, após isso, foi utilizado um segundo par de primer que compreende uma região interna de 520 nucleotídeos. Através da otimização deste ensaio, foi demonstrado que esta técnica se caracterizava por ser uma forma mais rápida e menos trabalhosa que o isolamento viral em cultivo celular (SIMIONATTO et al., 2005).

Van Santen et al. (2004) padronizaram uma técnica de qPCR utilizando primers específicos para amplificar 181 nucleotídeos que codificam o gene para proteína VP2, além de uma porção do gene para proteína VP3 e VP1, sendo capaz de detectar o vAIG a partir de amostras de soros, demonstrando ser uma técnica altamente sensível e rápida na detecção de anticorpos neutralizantes quando comparada com outras técnicas.

Devido a presença de diferentes patógenos responsáveis por causar doenças imunossupressoras em aves, foram desenvolvidas técnicas que em apenas uma reação torna-se possível realizar a detecção de diversos agentes patogênicos. Em 2019, foi desenvolvido um protocolo de qPCR capaz de realizar a detecção de vAIG e do vírus da Doença Infecciosa da

Bursa de Fabricius (vDIB) de forma única ou simultaneamente, sendo os vírus detectados a partir de amostras de bursas, onde foi demonstrado que as técnicas executadas apresentavam sensibilidade e especificidade elevadas, com projeções positivas nos aspectos de vigilância e controle destes agentes de uma forma mais eficiente (TECHERA et al., 2019).

Cong et al. (2018) também desenvolveu uma *Multiplex* PCR com capacidade de realizar a detecção simultânea de cinco vírus imunossupressores que acometem galinhas, sendo estes, Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas, Reovírus aviário, Doença Infecciosa da Bursa de Fabricius, Doença de Marek e Reticuloendoteliose aviária, onde foi demonstrado que a técnica foi capaz de realizar a detecção dos agentes sem quaisquer interferência na reação, podendo ser uma ferramenta adicional para epidemiologia molecular.

Um estudo relacionado a análise filogenética do vAIG em Minas Gerais, demonstrou que através do sequenciamento de quatorze estirpes obtidas do vAIG, cuja caracterização genética foi dada através da análise das variações encontradas na região do DNA que codifica para as proteínas VP2 e VP3. Pode ser observado que a substituição de aminoácido de A (alanina) para V (valina) na posição 153 da proteína VP2 acarretaram mudança na sequência de aminoácidos, onde foi sugerido que esta substituição pode estar inteiramente relacionada com a perda de tropismo pelas células de linhagem MSB-1 (BARRIOS, 2009).

Na China, foi realizada a caracterização molecular do genoma completo do vAIG, através de 24 estirpes que foram detectadas entre os anos de 2014 a 2015. Na análise filogenética, foi demonstrado que as 121 sequências do genoma do vAIG analisadas na árvore, foram distribuídas em oito linhagens, onde as 24 sequências das amostras obtidas a partir do estudo ficaram dispersas em diferentes clados. Além disso, foram identificadas 33 substituições a partir da análise dos 450 aminoácidos pertencentes ao gene para proteína VP1. A partir deste estudo, foi estabelecido um sistema robusto de classificação para vAIG, mostrando a necessidade de realização de estudos aprofundados sobre o genoma e epidemiologia do vAIG. (LI et al., 2017).

2.12 Prevenção e controle

As principais medidas de controle da doença visam diminuir a transmissão vertical e prevenir as coinfeções com outros agentes imunossupressores, geralmente, em lotes de reprodutoras se infectam em recria transmitindo anticorpos maternos protetores e progênie.

É importante salientar que o controle da AIG é baseado na transferência de imunidade passiva das matrizes para a progênie, assegurando que as reprodutoras desenvolvam anticorpos

ao vAIG antes do início da postura, evitando que a transmissão vertical ocorra e ao mesmo tempo promova a transferência de anticorpos maternos protetores para a progênie, assim, reduzindo a ocorrência e o surto da doença em campo (VIELITZ e LANDGRAF, 1988).

É bastante utilizada as vacinas vivas atenuadas conferindo imunização precoce aos lotes que estão suscetíveis, competindo ativamente contra o vírus vacinal e seus efeitos deletérios na resposta imunológica das aves. Com essa imunização ocorre a obtenção de títulos alto e uniformes reprodutoras, para assim se ter uma segura transferência de anticorpos passivos junto a progênie. A imunização das reprodutoras deve ser realizada algumas semanas antes do início da produção, fazendo a vacina entre 10 e 18 semanas de idade, sua aplicação é via água de bebida conferindo grande eficiência no controle da doença. (VIELITZ et al., 1987; 1991).

Não se deve vacinar as reprodutoras entre 4 a 5 semanas antes do início da produção de ovos, pois evita-se disseminar o vírus vacinal através do ovo. É essencial haver monitoria laboratorial por meio de teste sorológicos em planteis de reprodutoras para detectar anticorpos anti-AIG por volta de 10 a 12 semanas de idade. Se houve detecção do vírus, a vacinação em um lote de reprodutoras em recria pode ser suprimida. É importante implantar programas de imunização em toda cadeia produtiva avícola com linhas puras, sendo bisavós, avós e matrizes, e assim, permitindo que se estabeleça um processo de competição ativo entre o vírus vacinal e o vírus campo. (BRENTANO et al., 2009).

Reforçando as vacinações contra as prováveis doenças imunossupressoras, como: Doença de Gumboro, Doença de Marek, Reovírus entre outras. Se faz necessário controlar enfermidades respiratórias como, a bronquite infecciosa, doença de Newcastle, Laringotraqueite, Síndrome da Cabeça Inchada, Micoplasmoses). Devendo manter o controle efetivo dos níveis de micotoxinas das rações diminuindo possíveis fontes causadoras do estresse dos animais, implementando medidas rigorosas para a biossegurança em toda a granja e incubatórios. (FUSSEL et al., 1998; OSOWSKI et al., 2014).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Locais do estudo e coletas.

Todas as atividades executadas neste experimento foram realizadas no Laboratório de Sanidade Avícola (LASAVE) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública (DESP),

pertencente ao Instituto de Veterinária (IV) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica - RJ, Brasil.

Os locais estabelecidos para realização das coletas de amostras deste projeto foram criteriosamente observados afim de diferencia-los e posteriormente classifica-los em modelos de criação de subsistência e modelo de criação industrial, com o intuito de realizar o comparativo dos mesmos frente aos resultados obtidos.

Mapa de Localização das Coletas

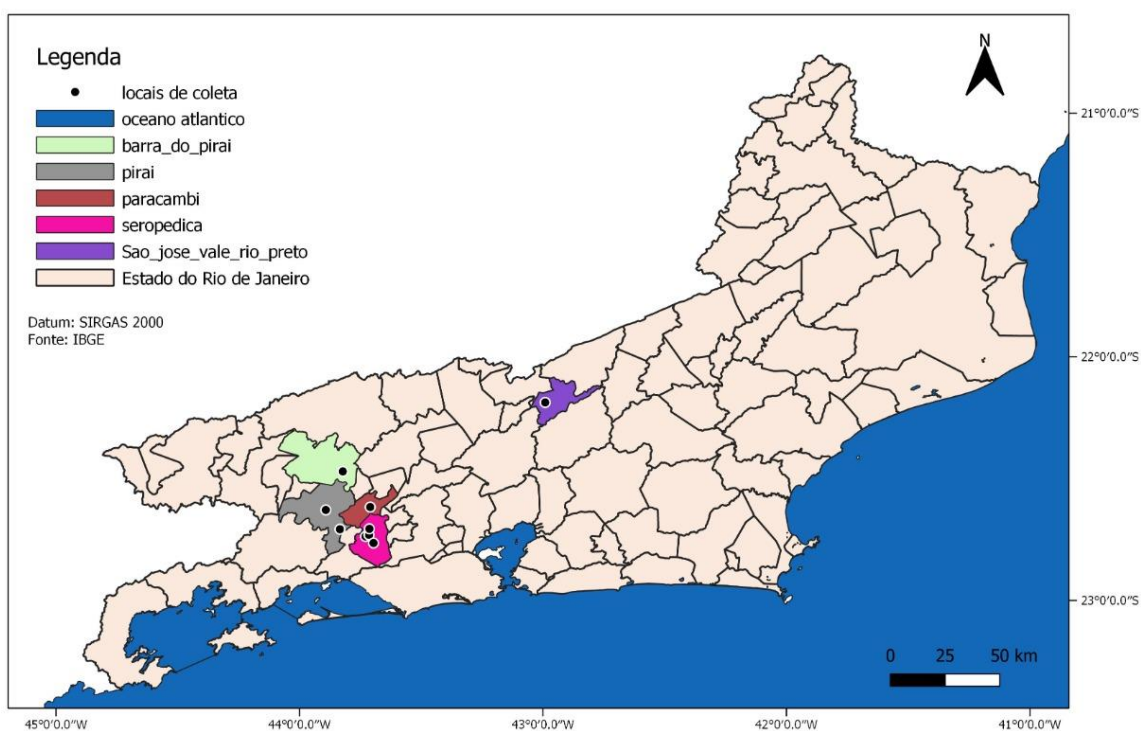


Figura 2: Distribuição dos locais de coletas onde foram realizadas amostragem de frangos de corte criados em sistema industrial e de subsistência. O mapa foi elaborado através do Software Quantum GIS (QGIS).

3.2 Coleta de amostras

A autorização do uso dos animais utilizados neste experimento foi concedida pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IV), sob protocolo nº 2541051118, do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

As coletas das aves foram realizadas em seis propriedades de criação do tipo subsistência e três propriedades de modelo de criação industrial, estas localizadas no Estado do

Rio de Janeiro (Tabela 1). As aves presentes nesse estudo foram cedidas pelos seus respectivos proprietários, onde foram selecionados através da observação de sinais como retardo no crescimento, empenamento ruim, palidez de cristas e barbelas além de presença de alterações na pele (sinais sugestivos de Anemia Infecciosa das Galinhas).

Após a coleta em suas respectivas propriedades, as aves foram encaminhadas para o Laboratório de Sanidade Avícola da UFRRJ, onde foram submetidas à eutanásia utilizando-se método permitido pela CEUA, que consiste na administração intracardíaca de superdosagem (dose 4x maior) de anestésico injetável Propofol Diprivan (2,6-diisopropilfenol). Após a eutanásia destas aves, foi feita a certificação da morte do animal através da verificação dos parâmetros como: ausência de movimento respiratório (apneia), ausência de batimentos cardíacos (assistolia), ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal com consequente realização da necropsia destas aves de forma sistêmica e criteriosa, onde foram coletados de 25mg de fragmento de timo, medula óssea, baço, fígado, tonsila cecal e Bursa de Fabricius de cada ave.

Após a coleta dos fragmentos de órgãos, as amostras foram devidamente identificadas e acondicionadas em microtubos de 1,5 mL contendo 400µL de solução para preservação de ácidos nucleicos (RNAlater Stabilization Solution - Thermo Fisher Scientific) e em seguida foram armazenadas a -20° C.



Figura 3: Aves oriundas das propriedades D e E de criação de subsistência utilizadas no estudo. (Fonte: Arquivo pessoal).

Tabela 1 – Informações das aves coletadas oriundas de criação de subsistência e industrial do Estado do Rio de Janeiro.

Granjas	Modelo de Criação	Aves	Idade
A	Subsistência	5	15 dias
B	Subsistência	5	21 dias
C	Subsistência	5	28 dias
D	Subsistência	5	19 dias
E	Subsistência	5	28 dias
F	Subsistência	5	27 dias
G	Industrial	10	37 dias
H	Industrial	10	23 dias
I	Industrial	10	50 dias

3.3 Extração do DNA total

A extração do DNA total das amostras coletadas foi realizada utilizando o Kit Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Minikit de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram retiradas do -20 °C e descongeladas lentamente sob refrigeração, em seguida foram cortados 25mg de cada amostra e foram pesadas na balança analítica de precisão. Essas amostras foram colocadas em tubo de 2,0 uL onde foi adicionado 180uL de “*Genomic Digestion Buffer*” e 20 uL de Proteinase K.

Após essa etapa as amostras foram incubadas em temperatura de 55°C no ThermoMixer até a lise completa dos tecidos, após esse procedimento de aquecimento, as amostras foram centrifugadas na velocidade de 15000g por 3 minutos. Retirando essas amostras da centrífuga foi adicionado 20 uL de RNase A dentro do lisado e levada ao vortex por 2 minutos. Após essa etapa foi adicionado 200 uL “*Genomic Lysis/Binding Buffer*” e vortexadas por 5 minutos até a amostra se encontrar totalmente homogênea. Após essa etapa foi adicionado 200 uL de etanol e transferido o lisado presente no tubo para a coluna sendo centrifugada a 10000g por 1 minuto em temperatura ambiente.

Após a centrifugação, foi descartado o tubo coletor e foi adicionado 500 uL de “*Wash Buffer 1*” na coluna e centrifugadas na velocidade de 15000g por 1 minuto, onde foi descartado o tubo coletor novamente e foram adicionados 500 uL de “*Wash Buffer 2*” e centrifugados na velocidade de 15000g por 3 minutos.

Após essa etapa foi descartado o tubo coletor e adicionado em tubo de 1,5 uL. Com isso, foi adicionado 100 uL de “*Genomic Elution Buffer*” na coluna. Para finalizar a extração, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 2 minutos e após essa etapa foi centrifugada na velocidade de 15000g por 3 minutos. A concentração e pureza de todas as amostras extraídas foram determinadas por espectrofotometria Nanodrop ND-2000® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA), alíquotadas em tubos 0,6 mL e acondicionados em freezer a -20 °C para análises moleculares posteriores.

3.4 Controle positivo das reações de PCR

O controle positivo foi obtido através da vacina viva liofilizada (cepa CAV P4) da empresa Nobilis®. Com consequente extração da vacina, seguindo o mesmo protocolo descrito no item 3.3 a partir de 25mg de amostra do vírus vacinal liofilizado. O DNA extraído da vacina foi quantificado através do espectrofotômetro Nanodrop ND-2000® (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e alíquotas de 30ng/μL foram armazenadas a -20°C para consequentes análises moleculares.

3.5 Detecção molecular do vAIG através da PCR

Inicialmente, foram selecionados três pares de primers conforme abaixo (Tabela 2), com consequente realização de testes de limite mínimo de detecção entre os referidos para otimizar as reações, verificando o primer ideal entre os três para amplificação do vAIG. As condições das reações utilizando os três pares de oligoiniciadores foram as mesmas, sendo executadas conforme descrito por Li et al. (2017) com algumas modificações, apresentando um volume final de 25 μL, contendo: 18,2 μL de H₂O ultra pura, 2,5 μL de tampão de PCR, 1,5 μL de MgCl₂, 0,5 μL de dNTP, 0,5 μL de cada primer, 0,3 μL de *Platinum Taq DNA* polimerase e 1 μL de DNA. As amplificações ocorreram em termociclador (Eppendorf) onde inicialmente sofreram uma desnaturação a 95°C por 5 minutos e posteriormente 30 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 50 segundos e 72°C por 60 segundos e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos oriundos da análise anteriormente descrita foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. A eletroforese ocorreu a 110V por 40 minutos em tampão TAE (Tris-Ácido Acético-EDTA). Os géis foram corados em brometo de etídio a uma concentração de 0,5 µg/ml (SIGMA) e visualizados sob luz ultravioleta e fotografados no equipamento L-Pix Touch (Loccus Biotecnologia).

3.6 Primers utilizados no experimento

Tabela 2 – Primers utilizados na detecção molecular do vAIG em amostras oriundas de granjas de criação de subsistência e industrial do Estado do Rio de Janeiro.

Primer	Sequencia 5' → 3'	Fragmento	Referência
F1	5' -GCATTCCGAGTGGTTACTATTCC- 3'	843pb	Li et al., 2017
R1	5' -CGTCTTGCCATCTTACAGTCTTAT- 3'		Li et al., 2017
F2	5' -CGAGTACAGGGTAAGCGAGCTAAA- 3'	989pb	Li et al., 2017
R2	5' -TGCTATTCATGCAGCGGACTT- 3'		Li et al., 2017
F3	5' -ACGAGCAACAGTACCCTGCTAT- 3'	802pb	Li et al., 2017
R3	5' -CTGTACATGCTCCACTCGTT- 3'		Li et al., 2017

3.7 Limite mínimo de detecção

Para a determinação do limite de detecção, foram realizadas diluições seriadas (1:10) obtendo-se cinco diluições a partir de uma amostra de vacina (Nobilis® CAV P4) com concentração inicial de 15 ng/µL. As diluições foram realizadas em água ultrapura (Sigma, Sant Louis, USA), em volume suficiente para realização dos testes. As diluições foram submetidas a técnica de PCR-convencional, onde foram testados os três pares de primers descritos no item 3.6, com as mesmas condições estabelecidas no item 3.5, dessa forma visando verificar o primer ideal deveria ser posteriormente utilizado para a detecção do vAIG.

3.8 Purificação dos produtos de PCR e sequenciamento

As purificações dos produtos de PCR obtidas a partir das amostras positivas foram realizadas através do Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo as recomendações do fabricante, após esta etapa, as amostras foram acondicionadas no -20°C para consequente envio para o sequenciamento. O sequenciamento foi realizado no Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo (USP) utilizando o equipamento ABI 3730 DNA Analyser – Applied Biosystems/Perkin Elmer, CA, USA).

3.9 Análise e alinhamento das sequências do vAIG

A qualidade das sequências foi analisada no software CLC Main Workbench Version 20.0.3 (Qiagen Bioinformatics) através da avaliação do cromatograma. Os “contigs” foram montados no mesmo programa e a similaridade de cada sequência foi avaliada através de uma busca inicial por meio da ferramenta BLAST disponível no endereço eletrônico (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Para realização da análise do alinhamento, foram selecionadas sequências de referências de nucleotídeos que continham o genoma completo do vAIG e todas as sequências do gene *vp1* do Brasil depositadas no Genbank. As referidas sequências do vAIG foram traduzidas a sequências de aminoácidos e o alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo ClustalW obedecendo a configuração padrão do software MEGA X.

As análises de polimorfismo na sequência de peptídeo da proteína VP1 do vAIG foram realizadas utilizando o software CLC Main Workbench Version 20.0.3 (Qiagen Bioinformatics).

Para entender o grau de variação na proteína VP1, a entropia do alinhamento da sequência de aminoácidos foi realizada usando o software BioEdit versão 7.0.9.0 (Hall, 1999).

3.10 Análises filogenéticas

Para as análises filogenéticas, foram selecionadas as sequências de referências de nucleotídeos que continham o genoma completo contendo os genes das proteínas VP1, VP2 e VP3 do vAIG, publicadas em periódicos indexados e disponíveis no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

A hipótese filogenética foi realizada pelo método “Maximum Likelihood”, utilizando o software MEGA X (Tamura et al., 2013). A análise do melhor modelo de substituição foi também realizada no software MEGA X. O modelo de substituição de nucleotídeos utilizado

foi Kimura-2-parâmetros com G + I. As árvores filogenéticas foram calculadas utilizando o método de “Bootstrap” com 1000 de pseudorréplicas.

Tabela 3 – Estirpes do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG) disponíveis no banco de dados GenBank utilizadas para comparação das estirpes isoladas no estudo.

ISOLADOS	CÓDIGO DE ACESSO	ORIGEM
BD-3	AF395114	Alemanha
Genes ORF1, ORF2 e ORF3	M55918	Alemanha
Germany Cuxhaven-1	M81223	Alemanha
CAV-18	KJ872514	Argentina
704	U65414	Austrália
10	U66304	Austrália
C14	EF176599	China
AH6	DQ124935	Anhui/China
AH4	DQ124936	Anhui/China
BJ0401	DQ124934	Beijing/China
GD-103	KU050678	Guangdong/China
GD-104	KU050679	Guangdong/China
GD-102	KU050677	Guangdong/China
GD-101	KU050680	Guangdong/China
LF4	AY839944	Hebei/China
CAV	AF475908	Heilongjiang/China
HLJ14101	KY486136	Heilongjiang/China
HLJ15108	KY486137	Heilongjiang/China
HLJ15109	KY486138	Heilongjiang/China
HLJ15125	KY486139	Heilongjiang/China
JL14026	KY486147	Heilongjiang/China
LN15170	KY486155	Heilongjiang/China
JS15165	KY486152	Jiangsu/China
JS15166	KY486153	Jiangsu/China
LN15169	KY486154	Jiangsu/China
JL14023	KY486145	Jilin/China
JL14024	KY486146	Jilin/China
JL14028	KY486148	Jilin/China
JL15120	KY486149	Jilin/China
NX15091	KY486150	Ningxia/China
NX15140	KY486151	Ningxia/China
SD24	AY999018	Shandong/China
SD22	DQ141673	Shandong/China
SDLY08	FJ172347	Shandong/China
SD1403	KU221054	Shandong/China
SH11	DQ141670	Shanghai/China
SH16	DQ141671	Shanghai/China
TJBD33	AY843527	Tianjin/China
TJBD40	AY846844	Tianjin/China
HN9	DQ141672	Tianjin/China
CIAV89-69	JF507715	Coreia do Sul
98D06073	AF311900	Estados Unidos da América
01-4201	DQ991394	Estados Unidos da América
CIA-1	L14767	Estados Unidos da América
26P4	D10068	Holanda
C369	AB046590	Japão
G6	AB119448	Japão
Genes CA2, CA1 e CA3	D31965	Japão
SMSC-1	AF285882	Malásia
98D02152	AF311892	Malásia
3-1	AF390038	Malásia

3.11 Análise estatística

A frequência de amostras positivas obtidas através da PCR nas criações de modelo de subsistência e industrial foi comparado pelo Teste Exato de Fisher utilizando o software BioEstat 5.3 (AYRES, 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Limite mínimo de detecção

Através da realização dos testes de limite de detecção dos três pares de primers pré-estabelecidos, foi observado que a amostra utilizando os primers F1/R1 foi possível ser detectada até a segunda diluição realizada, que corresponde a 1,5 ng/μL de amostra, com o primer F2/R2 foi possível detectar até a terceira diluição que corresponde a 0,15 ng/μL de amostra, e por fim no primer F3/R3, que foi detectado até a segunda diluição que corresponde a 1,5 ng/μL de amostra. Através destes resultados pode-se constatar que o primer F2/R2 apresentou um melhor desempenho quando comparado com os outros dois pares de primers. Sendo o referido primer selecionado para detecção do vAIG através de tecidos previamente coletados.

Vale ressaltar a importância da determinação do limite mínimo de detecção de uma amostra, visto que é uma característica fundamental no que se diz respeito ao desempenho do ensaio empregado no estudo em questão (LAWNSON, 1994).

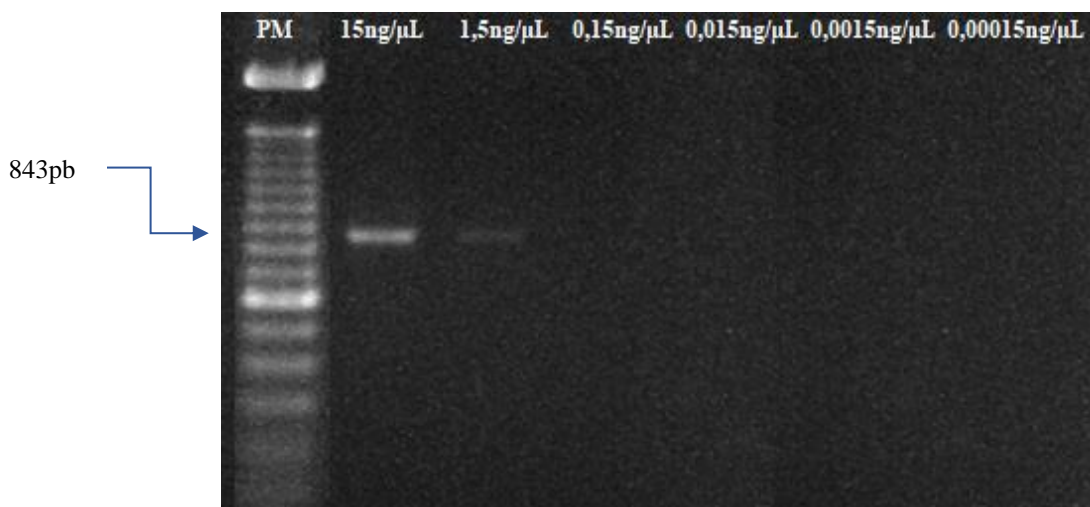


Figura 4- Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos obtidos através do teste de limite mínimo de detecção do Primer F1/R1 de 843pb. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 1KB (Invitrogen); Linhas 2 e 3: diluições amplificadas; Linhas 4,5,6 e 7: diluições não amplificadas.

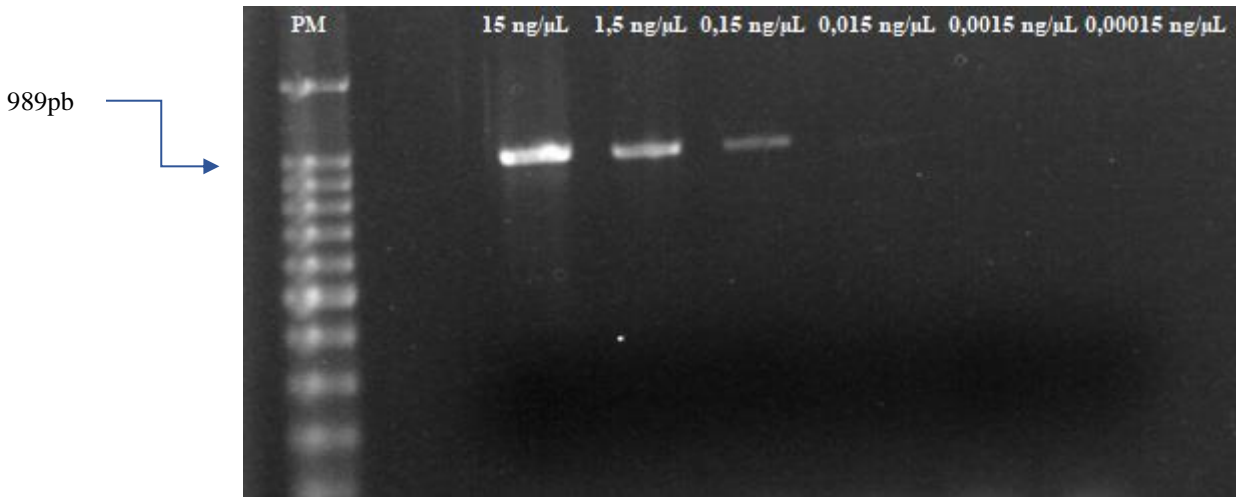


Figura 5- Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos obtidos através do teste de limite mínimo de detecção do Primer F2/R2 de 989pb. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 1KB (Invitrogen); Linhas 3,4 e 5: diluições amplificadas; Linhas 6, 7 e 8: diluições não amplificadas.

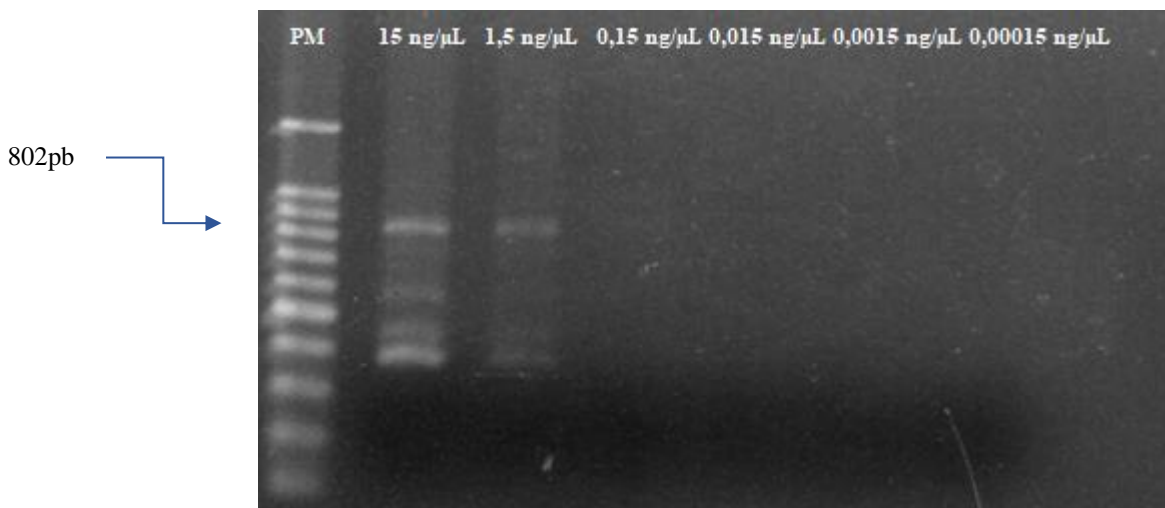


Figura 6- Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos obtidos através do teste de limite mínimo de detecção do Primer F3/R3 de 802pb. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 1KB (Invitrogen); Linhas 2 e 3: diluições amplificadas; Linhas 4,5 6 e 7: diluições não amplificadas.

4.2 Detecção molecular do vAIG através da PCR

Foram avaliados de cada ave a presença do vAIG em tecidos do baço, timo, medula óssea, fígado, tonsila cecal e bursa de fabricius. Foi considerada positiva a ave em que fosse detectado o vírus em pelo menos um dos órgãos supracitados. Por meio deste critério foram obtidos 21,6% (n=13/60) de aves positivas independente se o sistema de criação, subsistência ou industrial. Nas granjas C-SUB 60% (n=3/5), F-SUB 60% (n=3/5), G-IND 60% (n=6/10) e I-IND 10% (1/10) das amostras analisadas por PCR foram positivas para o vAIG, nas granjas B-SUB, C-SUB, D-SUB, E-SUB e H-IND não foram detectadas a presença do vAIG conforme demonstrado na tabela 4. Em granjas de criação de subsistência observou-se uma frequência de 20% (n=6/30), ligeiramente inferior a frequência de 23,33% (n=7/30) observada em granjas de criação industrial. A frequência de animais positivos para o vAIG não apresentou diferença significativa ($p>0,05$) (Figura 5).

Tabela 4. Frequência de amostras positivas para o Vírus da Anemia Infecciosa as Galinhas detectados através da PCR em granjas de sistema de criação de subsistência e industrial localizadas no Estado do Rio de Janeiro.

Granjas	Positivo n	Negativo N	Frequência %
A-SUB	0	5	0
B-SUB	0	5	0
C-SUB	3	2	60%
D-SUB	0	5	0
E-SUB	0	5	0
F-SUB	3	2	60%
G-IND	6	4	60%
H-IND	0	10	0
I-IND	1	9	10%

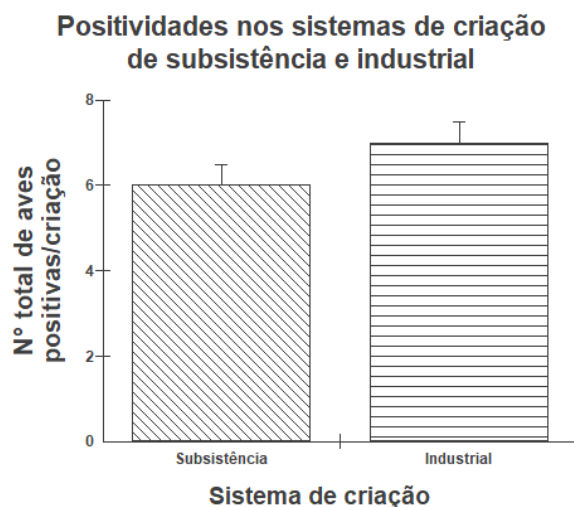


Figura 7: Comparação do número total de animais positivos para o vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas entre sistema de criação de subsistência e industrial através da técnica de PCR.

O vAIG após sua descrição inicial, vêm sendo amplamente detectado em sistema de criação de subsistência, quanto em sistema de criação industrial, em várias partes do mundo (SCHAT et al., 2003), como é o caso do presente estudo, em que foi possível demonstrar a presença do vAIG em ambos sistemas de criações.

Os sistemas de criações de subsistência onde posteriormente foram realizadas as coletas (Propriedade A, B, C, D, E e F), apresentavam em geral condições semelhantes em relação ao manejo, biosseguridade e os aspectos sanitários. Os pintinhos criados eram em um sistema extensivo, ou seja, criados ao ar livre, sem utilização de alimentação balanceada, onde a mesma era composta por diversos alimentos. As condições higiênico-sanitárias eram extremamente insatisfatórias, sendo observada em todas as propriedades, uma exacerbada presença de fezes nos locais próximos aos comedouros, bebedouros e camas aviárias, além de uma ampla presença de outras espécie de animais presentes nestas propriedades, em contato direto com estas aves, tais como: pombos, perdizes, faisões, cães, gatos, bois e cavalos. Essas características observadas nas granjas de subsistência são propícias a introdução de patógenos primários e oportunistas nos locais, sendo uma situação extremamente séria, demonstrando a precária situação sanitária nos sistemas de criações de subsistência estudados.

Em contrapartida, os sistemas de criação industrial, onde posteriormente foram realizadas as coletas (Propriedades G, H e I), foi possível observar nestes locais a utilização sem restrição de anticoccidianos, promotores de crescimento e quimioterápicos nas rações

destas aves, condições higiênico-sanitárias adequadas dos ambientes onde estas aves estavam alojadas, além de ser observado um rigoroso controle do pessoal da granja para evitar o contato de outras espécies com esses animais, além do controle de entrada de pessoas nos galpões, limpeza regulares dos galpões, além de programas de vacinações pré-estabelecidos, de maneira geral, apresentando um sistema de biosseguridade adequado as condições destes locais. A diferença entre a frequência de positivities entre a propriedade G (60%) e propriedade I (10%), podem estar inteiramente relacionadas a origem destas aves. O vAIG pode ser transmitido de forma vertical e o pintinho pode ter sido introduzido na granja infectado. Uma vez o animal infectado seja introduzido na granja este pode servir como fonte de infecção para os demais animais do galpão (BRENTANO et al., 1990; HOOP et al., 1992).

Aves inseridas no modelo de subsistência, rotineiramente são impostas a obstáculos propiciados por diversos fatores presentes nos locais em que são criadas, ou seja, sendo desafiadas frente a patógenos de origem bacteriana, viral e fúngica. Além de outros desafios que estão correlacionados ao ambiente, tais como infraestrutura, manejo nutricional e a presença de predadores nestes locais, onde estas aves conseguem sobreviver a estes desafios sanitários e conseqüentemente apresentam uma maior resistência quando comparadas com aves oriundas de sistema de criação industrial, que por sua vez, não sofrem costumeiramente com estes obstáculos no ambiente em que são criadas, e acabam tornando-se mais susceptíveis ao surgimento destas infecções, onde mesmo sendo estabelecida medidas de biosseguridade para minimizar estes riscos, as mesmas posteriormente sofrem um maior impacto da infecção pelo vAIG (BARRIOS et al., 2009).

Outro aspecto relevante observado neste estudo, foi a detecção da presença do vAIG em duas das três propriedades de modelo industrial posteriormente analisadas. Visto que a introdução do vAIG no sistema industrial poderia ter sido originada por diversos fatores relacionados a biosseguridade, manejo e vacinação destas aves, tais como, a presença de pintos com ausência ou níveis baixos de anticorpos neutralizantes oriundos das matrizes, impactando nas respostas imunes de combate as vacinações e infecções pelo vAIG, que acarretam na infecção clínica destas aves com o desenvolvimento de sintomas e lesões. (BRENTANO et al., 2009).

A falha do monitoramento sorológico nas matrizes também é um fator capaz de propiciar a disseminação do vAIG nestas granjas industriais, onde sua realização de forma inadequada, dificulta o estabelecimento correto do estado imune dos lotes a partir de resultados dos testes sorológicos obtidos, inviabilizando a verificação adequada da necessidade de adoção

e delineamento de estratégias de controle do vAIG, comprometendo a garantia da uniformidade imunológica do lote e obtenção dos níveis adequados de anticorpos maternos para a proteção da progênie, conseqüentemente gerando um aumento na ocorrência de surtos da doença nestes locais (TODD et al., 2000 ; DHAMA et al., 2008).

Além destes, podemos destacar a possibilidade de introdução e permanência de cepas virais do vAIG através de falhas na biosseguridade nestas instalações industriais, que podem ser justificadas pelo fato de que o vAIG se caracteriza por ser um vírus não envelopado, apresentando elevada resistência no ambiente, e aos produtos comumente utilizados como estratégias de limpeza e desinfecção nestes galpões, resultando na maior permanência do vAIG nestas instalações, proporcionando uma rápida veiculação do vírus por fômites contaminados, provocando a infecção persistente com eliminação intermitente em indivíduos infectados (CHAT et al., 2003 ; TODD et al., 2004).

O percentual de positividade dos órgãos avaliados foi de 15,5% (56/360), quando avaliados separadamente, obteve-se 21,6% (n=13/60) em baço, 21,6% (n=13/60) em timo, 16,6% (n=10/60) em medula óssea, 11,6% (n=7/60) em fígado, 16,6% (n=10/60) em tonsila cecal e 5% (n=3/60) em Bursa de Fabricius (Figura 6).

Através da avaliação de positividade de órgãos por sistema de criação, foi possível observar que no modelo de subsistência, na granja C-SUB, obteve-se um percentual de 60% (n=3/5) em baço, 60% (n=3/5) em timo, 40% (n=2/5) em medula óssea, 40% (n=2/5) em fígado, 60% (n=3/5) em tonsila cecal e 0% (n=0/5) em bursa de fabricius. Na granja F-SUB, somente foi observada diferença no percentual de 60% (n=3/5) em medula óssea, 20% (n=1/5) em fígado e 20% em tonsila cecal. Os resultados foram comparados estatisticamente, onde não houve diferença significativa entre a positividade de órgãos obtidos a partir do modelo de subsistência ($p > 0,05$).

No modelo industrial, na granja G-IND, obteve-se um percentual de 60% (n=6/10) em baço, 60% (n=6/10) em timo, 50% (n=5/10) em medula óssea, 40% (n=4/10) em fígado, 50% (n=3/5) em tonsila cecal e 30% (n=3/10) em Bursa de Fabricius. Porém, na granja I-IND obteve-se 10% (n=1/10) em timo, 10% em baço e 10% (n=1/10) em tonsila cecal, onde não sendo obtida a presença do vAIG na medula óssea, fígado e bursa de fabricius. Através de análise estatística, foi possível observar diferença significava entre as positivities de órgãos entre a granja G-IND e I-IND ($p < 0,05$).

Os órgãos foram comparados estatisticamente entre si, onde foram observadas diferenças significativas somente entre o timo e baço frente ao comparativo com a bursa de fábricius ($p < 0,05$). Os demais órgãos analisados não apresentaram quaisquer diferenças significativas ($p > 0,05$). Dentre esta análise estatística executada, deve-se destacar a diferença significativa observada entre timo e bursa de fábricius, podendo relacionar a baixa positividade observada em bursa de fábricius, através de evidências que comprovam que o vAIG apresenta um elevado tropismo quando relacionados as células T, originárias dos linfócitos T que são diferenciadas no timo (HU et al., 1993), enquanto, na Bursa de Fabricius ocorre o desenvolvimento e maturação dos linfócitos B (SAYEGH e RATCLIFFE et al., 2000).

Neste estudo, foram preconizadas a coleta de órgãos linfóides primários e secundários, com a finalidade de verificar a possibilidade de detecção do vírus nos referidos tecidos. Através dos resultados obtidos, pode-se demonstrar que o vAIG foi detectado nos seis órgãos coletados, sendo que a maior positividade foi em timo, seguido pelo baço, medula óssea e tonsila cecal. Deve-se ressaltar que o timo é descrito como o órgão que contém uma maior carga de DNA viral quando comparado com os outros órgãos comumente analisados para detecção do vAIG (TODD et al., 1991). Além do timo, através de dados obtidos em estudo retrospectivo, torna-se extremamente necessária a inclusão do baço, medula óssea e fígado nas coletas de materiais para análise por métodos moleculares, uma vez que essa estratégia pode aumentar a sensibilidade da técnica de PCR para a detecção molecular de forma mais eficiente do vAIG através da PCR (NOGUEIRA e BRENTANO, 2005).

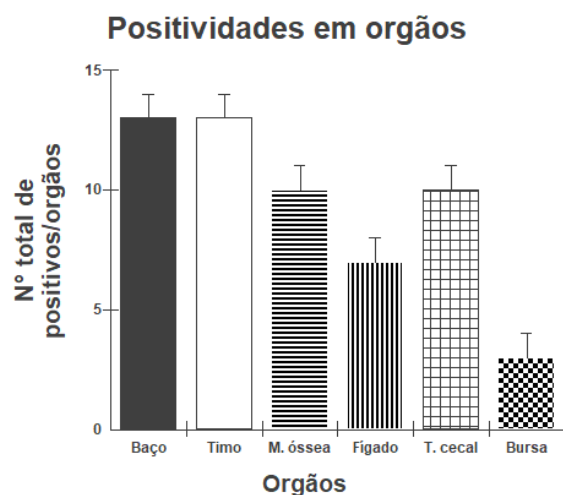


Figura 8: Comparação do número total de aves positivas pela técnica de PCR entre os órgãos coletados em granjas de criação industrial e de subsistência para detecção do vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas.

Tabela 5. Amostras de órgãos de aves positivas para o Vírus da Anemia Infecciosa as Galinhas, que foram detectados através da PCR em granjas de sistema de criação de subsistência e industrial localizadas no Estado do Rio de Janeiro.

Granja	Aves	Baço	Timo	Médula óssea	Fígado	Tonsila cecal	Bursa
A-SUB	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
B-SUB	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
C-SUB	5	3/5	3/5	2/5	2/5	3/5	0/5
D-SUB	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
E-SUB	5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
F-SUB	5	3/5	3/5	3/5	1/5	1/5	0/5
G-IND	10	6/10	6/10	5/10	4/10	5/10	3/10
H-IND	10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
I-IND	10	1/10	1/10	0/10	0/10	1/10	0/10

989bp

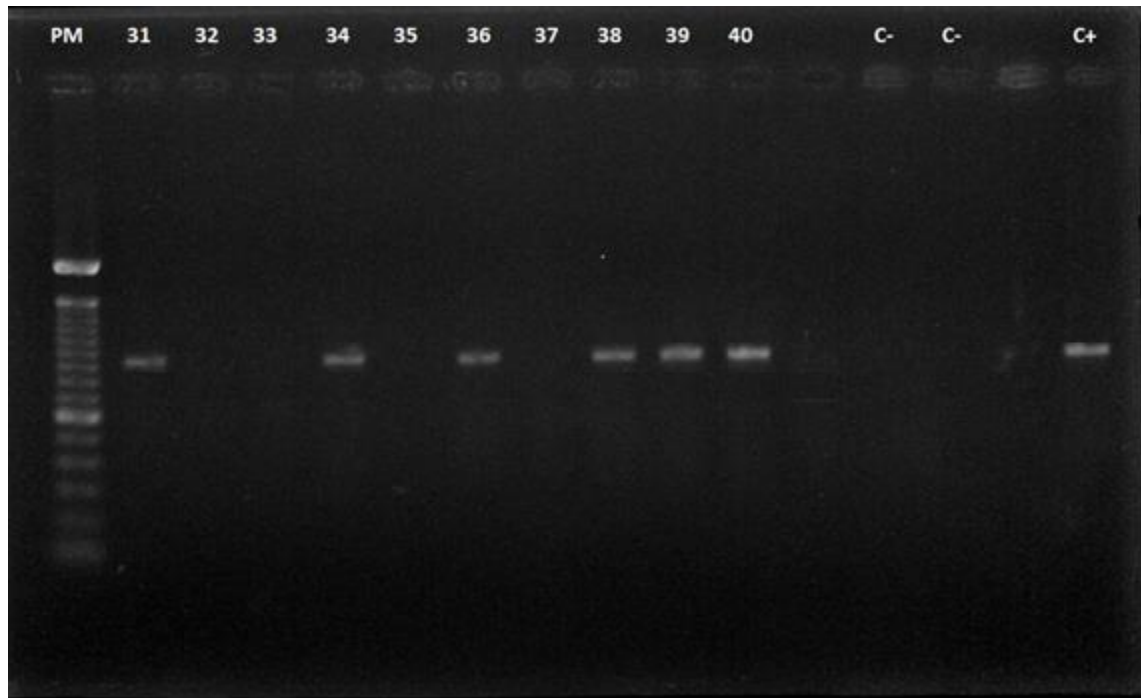


Figura 9: Gel de agarose a 1% demonstrando os produtos da PCR amplificados com 989pb do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas. Linha 1: Peso Molecular (PM) de 100bp (Invitrogen); Linha 2,4,6,8,9,10: amostras positivas: Linhas 2, 3, 5 e 7: amostras negativas; Linha 13 e 14: Controle negativo e Linha 16: Controle positivo. (Propriedade G).

4.3 Análise das sequências do vAIG

As amostras do vAIG sequenciadas do presente estudo foram alinhadas e comparadas com isolados que continham o genoma completo do vAIG disponíveis no GenBank. Dentre as duas amostras analisadas do sistema de criação de subsistência, temos a amostras 12 e 13- RJ – Brasil – Criação de Subsistência, que apresentaram uma maior identidade genética com as cepas virais isoladas no Japão (AB119448), Malásia (AF285882), Austrália (U65414) e Argentina (KJ872514), Província de Anhui na China (DQ124936), Província de Shandong na China (KU221054), além de isolado oriundo do Estados Unidos da América (AF311900). As amostras 12 e 13- RJ – Brasil – Criação de Subsistência apresentaram um percentual de identidade que variou de 97.64% a 98.58% e 97.43% a 98.74%, respectivamente com as cepas virais citadas acima.

As duas amostras analisadas do sistema de criação de industrial, foram as amostras 31 e 36- RJ – Brasil – Criação Industrial, onde apresentaram uma maior identidade genética com as cepas virais isoladas no Japão (AB119448), Malásia (AF285882), Austrália (U65414) e Argentina (KJ872514). da Província de Anhui na China (DQ124936), Província de Shandong

na China (KU221054), além de isolado oriundo do Estados Unidos da América (AF311900), apresentando um percentual de identidade que variou de 97.95% a 98.74%.

Através da comparação com as sequências do gene VP1 de isolados do Brasil depositadas no Genbank, foi possível observar que nas amostras 12 e 13- RJ – Brasil – Criação de Subsistência, apresentaram um percentual de identidade variando de 94.90% a 99.83% e 94.56% a 99.98%, respectivamente, onde a amostra 12- RJ – Brasil – Criação de Subsistência, apresentou uma maior identidade genética com as cepas virais isoladas em Brasília (MN175605) e Minas Gerais (KJ865864) e (KJ865871), e uma menor identidade genética com as cepas virais isoladas em Minas Gerais (KJ865869) e (KJ865877), Santa Catarina (AY739215) e São Paulo (AY633926). A amostra 13- RJ – Brasil – Criação de Subsistência, apresentou uma maior identidade genética com as cepas virais isoladas em Santa Catarina (AY739213) e Rio Grande do Sul (KY024579) e (MG846991), e uma menor identidade genética com as cepas virais isoladas em Minas Gerais (KJ865869) e (KJ865877), Santa Catarina (AY739215) e São Paulo (AY633926).

As amostras 31 e 36- RJ – Brasil – Criação Industrial, apresentaram um percentual de identidade variando de 94.56% a 99.83%, onde ambas apresentaram uma maior identidade genética com as cepas virais isoladas em Brasília (MN175605) e Minas Gerais (KJ865864) e (KJ865871), e uma menor identidade genética com as cepas virais isoladas em Minas Gerais (KJ865869), (KJ865876) e (KJ865877). (Figura 10).

A análise dos aminoácidos do estudo foi realizada entre os resíduos de 1 a 194, abrangendo uma porção do genoma do vAIG que codificam o gene para proteína VP1. As amostras 12 e 13-RJ- Brasil – Criação de Subsistência e 31 e 36 RJ- Brasil – Criação Industrial apresentaram as mesmas substituições de aminoácidos como: histidina (H) por glutamina (Q) na posição 22, valina (V) por isoleucina (I) na posição 75, metionina (M) por leucina (L) na posição 97, fenilalanina (F) por tirosina (Y) na posição 98, lisina (K) por glutamina (Q) na posição 139 e ácido glutâmico por glutamina (Q) na posição 144.

Diversos estudos são realizados com a finalidade de uma maior compreensão da epidemiologia molecular do vAIG, onde as três proteínas virais que constituem o genoma do vAIG (VP1, VP2 e VP3) são fundamentais para a obtenção destes dados. Dentre estas, a proteína VP1 tem sido mais utilizada para caracterização do vAIG em estudos moleculares, em decorrência de sua elevada variabilidade genética quando comparada com as outras duas proteínas virais pertencente ao vAIG. (NOTEBORN et al., 1992; CRAIG et al., 2009).

Desta forma, a sequência do gene VP1 é normalmente utilizada para determinar a relação de diferentes isolados do vAIG, devido ao fato de que a maioria das substituições de

aminoácidos entre os isolados estão concentrados na metade N-terminal da proteína VP1 (CRAIG et al., 2009; HAILEMARIAM et al., 2008).

Com a finalidade de aprofundamento sobre o gene que codifica a proteína VP1 pertencente ao genoma do vAIG, vários autores confirmaram que uma região hiper variável que abrange 13 aminoácidos em VP1, da posição 139 a 151, afeta o crescimento e propagação viral, especialmente os resíduos 139 e 144. Considera-se que esses resíduos desempenham papéis importantes a este respeito, considerando que polimorfismos nas posições 139 e/ou 144 glutamina (Q) da proteína VP1 mostram uma diminuição da capacidade de propagação (RENSHAW et al., 1996; LI et al., 2017).

Em estudo realizado na China, foram determinados oito aminoácidos que sofrem seleção positiva na proteína VP1, através do método Bayesiano empírico, onde quatro aminoácidos na posição 75, 125, 141 e 144, estão relacionados na atenuação do vAIG, além do aminoácido na posição 287, que está inteiramente relacionado aos aspectos de virulência do vAIG, outros três aminoácidos na posição 139, 370 e 470 também sobrem seleção positiva, onde a seleção ocorre em aminoácidos específicos do gene que codifica a proteína VP1 (WANG et al., 2009). Neste estudo, conforme mencionado anteriormente, as referidas sequências das amostras apresentaram substituições nos aminoácidos na posição 22, 75, 97, 98, 139 e 144, visto que as análises foram realizadas somente até o aminoácido de posição 194, que contempla somente uma porção do gene que codifica para a proteína VP1.

As sequências de amostras obtidas no estudo foram comparadas com a sequência da estirpe Cux-1, comumente utilizada na confecção de vacina comerciais contra o vAIG, onde foi possível observar um elevado percentual de similaridade que variou entre 95-96% entre as sequências avaliadas. Sendo possível sugerir uma inter-relação entre a origem do vAIG em granjas industriais e de subsistência a partir da utilização de vacinas comerciais contaminadas na década de 90, conforme relatado por Barrios et al. (2009), através da realização de estudos filogenético do vAIG em granjas comerciais e de subsistência.

Torna-se imprescindível o estudo da variabilidade genética do vAIG, onde a compreensão de forma aprofundada a estrutura molecular e antigênica dos isolados, torna-se possível determinar a relação de vAIG circulante com cepas vacinais e outros isolados do vAIG, permitindo gerar dados cruciais para uma melhor avaliação da prevalência do vAIG nestes modelos de criações, visando proporcionar estratégias de controle da AIG de forma mais eficiente.

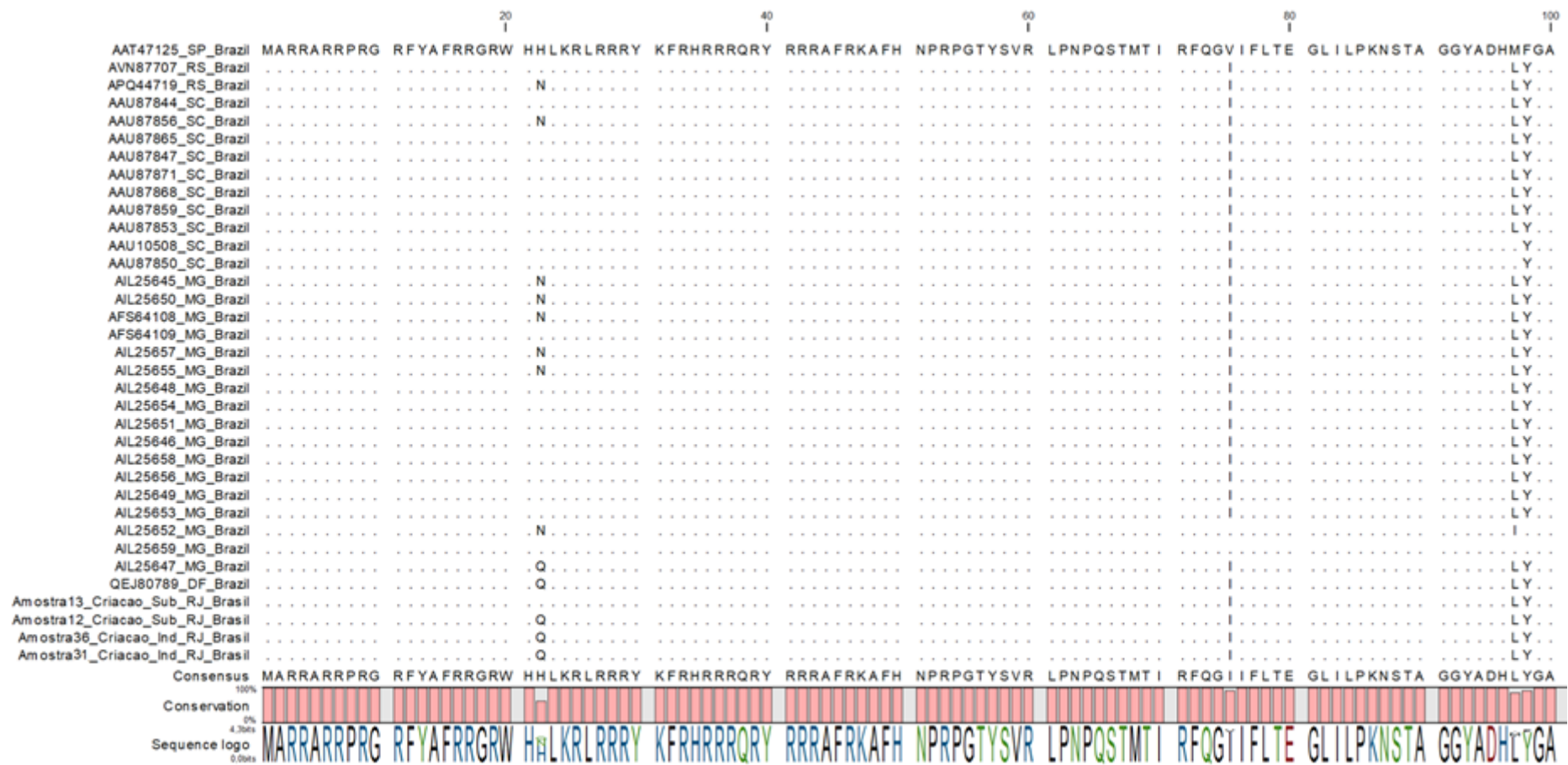


Figura 11. Alinhamento local de aminoácidos de um fragmento parcial da proteína VP1 do Vírus da Anemia Infeciosa das Galinhas (vAIG), obtidas de frangos de corte de criação industrial e de subsistência no estado do Rio de Janeiro com outras sequências da proteína VP1 do vAIG de diversos estados do Brasil. A sequência de peptídeo AAT47125 oriunda de frangos de corte do estado de São Paulo foi utilizado como referência por ser a mais atinga depositada no Genbank.

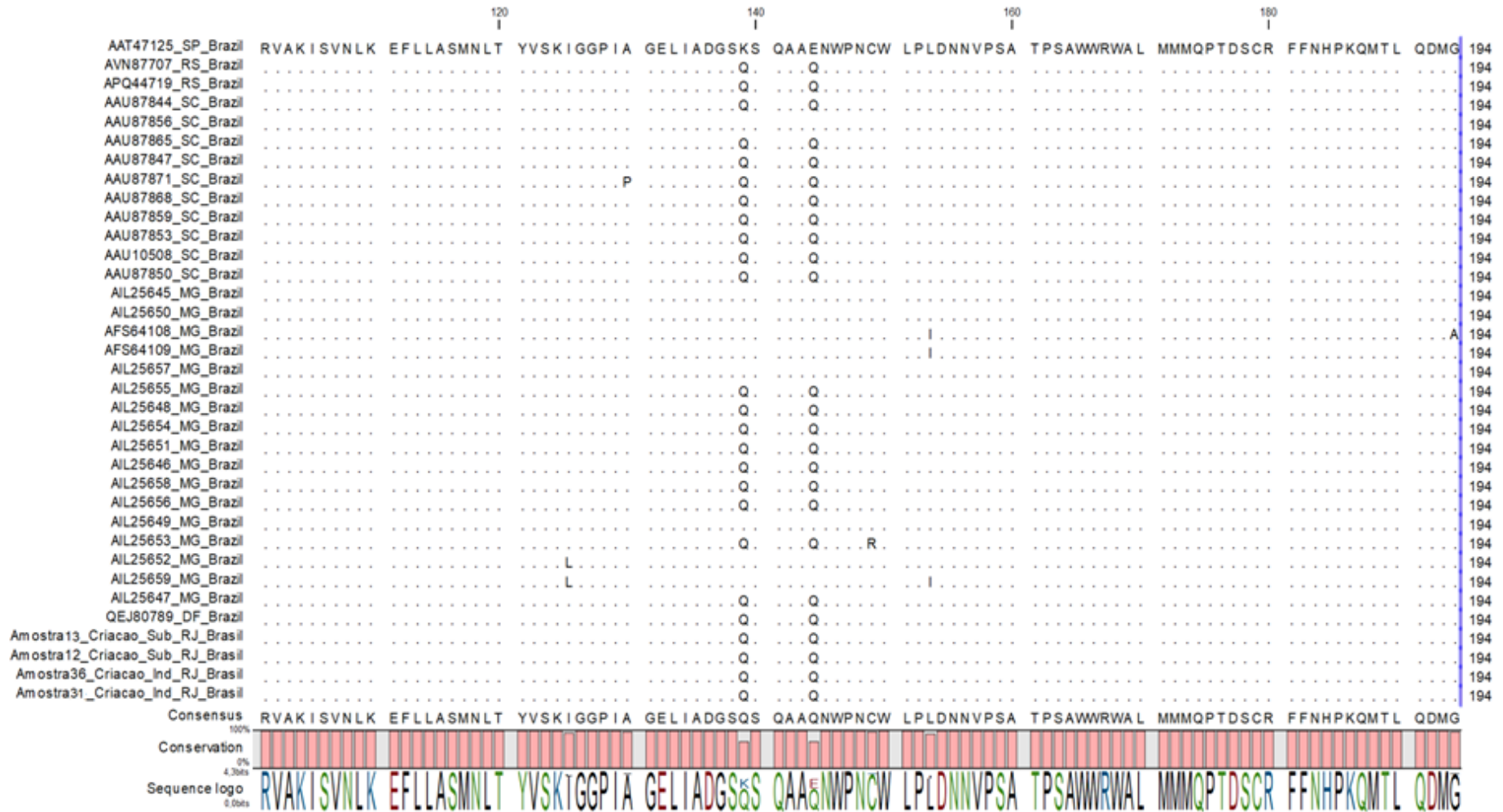


Figura 12. Alinhamento local de aminoácidos de um fragmento parcial da proteína VP1 do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas (vAIG), obtidas de frangos de corte de criação industrial e de subsistência no estado do Rio de Janeiro com outras sequências da proteína VP1 do vAIG de diversos estados do Brasil. A sequência de peptídeo AAT47125 oriunda de frangos de corte do estado de São Paulo foi utilizado como referência por ser a mais atinga depositada no Genbank.

O resultado da análise de entropia dos alinhamentos de aminoácidos deduzidos da sequência de peptídeo da proteína VP1 revelou a existência de quatro picos de entropia com valores superiores a 0,4. Um valor de entropia maior que 0,4 indica que um sítio específico não foi conservado. No presente estudo, o valor da entropia variou de 0,14 a 0,79 no fragmento de 194 aminoácidos analisados. Nos aminoácidos deduzidos da proteína VP1, houve um pico com um valor aproximado de 0,79 na posição 22. Esse valor indicou uma alta variabilidade genética nesse sítio entre as amostras brasileiras do vAIG (Figura 13).

Os sítios cujo valores de entropia são elevados, comumente apresentam uma maior probabilidade de sofrerem mutações, onde posteriormente o saldo desta alteração podem se relacionar com os aspectos de antigenicidade, patogenicidade e tropismo do vírus (DUCATEZ et al., 2006). Sendo assim, através da análise de entropia da sequência de aminoácidos, os picos originados a partir dos aminoácidos na posição 22 e 98, apresentaram substituições que não foi possível relacionar com s fatores salientados acima, porém, os picos observados nos sítios dos aminoácidos na posição 139 e 144, podem ser relacionados com o vAIG devido sua atuação na influência no tropismo e níveis do crescimento viral. (RENSHAW et al., 1996; LI et al., 2017).

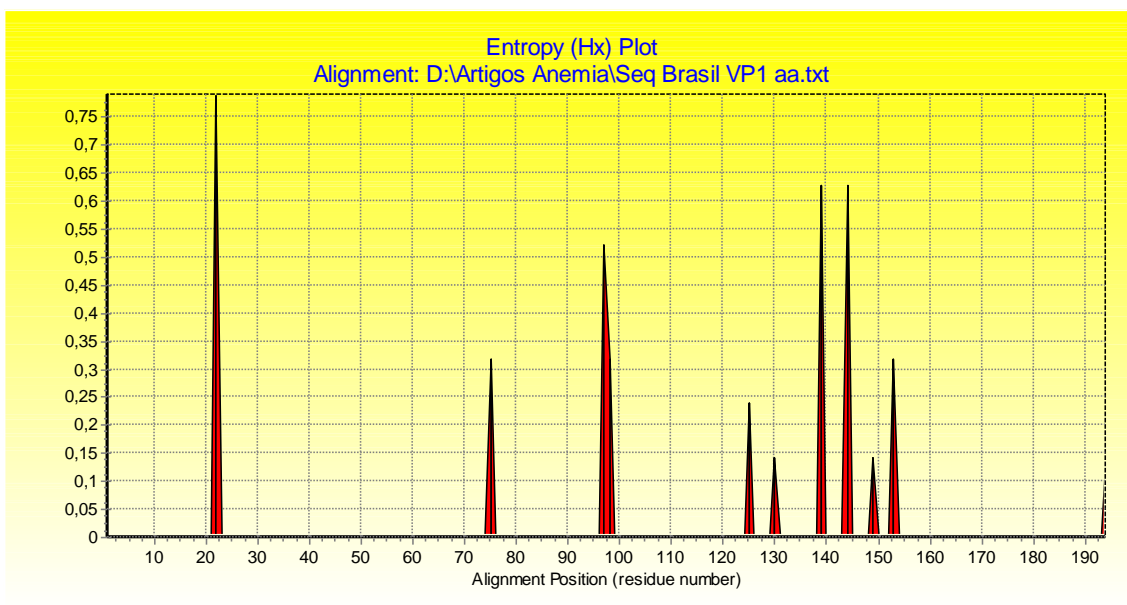


Figura 13. Gráfico de entropia obtida através do alinhamento de sequência de peptídeos da proteína VP1 do Vírus da Anemia Infecciosa das Galinhas de amostras brasileiras.

4.4 Análises filogenéticas

As sequências dos nucleotídeos das 4 amostras virais detectadas e amplificadas nesse estudo foram analisadas filogeneticamente com outras 54 sequências selecionadas no GenBank e foram agrupadas em quatro clados distintos (A-D).

Todas as amostras obtidas a partir dos estudos se agruparam no clado D (Figura 14). Porém, a amostra 13- RJ - Brasil - Criação de Subsistência, agrupou-se no subgrupo D1, juntamente com outras amostras de diferentes países, como: Japão (AB119448), Malásia (AF285882), Austrália (U65414) e Argentina (KJ872514). As amostras 12 - RJ - Brasil - Criação de Subsistência, amostra 31 - RJ - Brasil - Criação Industrial e amostra 36 - RJ - Brasil - Criação de Industrial se agruparam no subgrupo D2, juntamente com amostras da Província de Anhui na China (DQ124936), Província de Shandong na China (KU221054), além de isolado oriundo do Estados Unidos da América (AF311900).

Islam et al. (2002) descobriram que quatro das 16 posições de aminoácidos comumente variáveis de todo o gene VP1 se concentram nesta pequena região, sendo estes, na posição 75 isoleucina (I) e/ou treonina (T), 97 leucina (L), 139 e 144 glutamina (Q), onde posteriormente, estas posições podem estar utilizadas para agrupar os isolados do vAIG em diferentes clados. No presente estudo, as quatro amostras apresentaram as mesmas substituições nas referidas posições citadas acima, sendo agrupadas em um único clado (Figura 14).

Esses resultados demonstram que existe uma semelhança genética entre a amostra 12 oriunda de criações de subsistência com as amostras oriundas de granjas de criação industrial, o que pode sugerir que no estado do Rio de Janeiro o vAIG das galinhas está circulando entre as granjas de criação de subsistência e as granjas de criação industrial. O agrupamento observado entre a amostra 12- RJ – Brasil, oriunda da criação de subsistência, juntamente com as duas amostras 31 e 36-RJ- Brasil, pertencentes a criação industrial, traz uma questão crítica no que se diz respeito ao aspecto da relação entre os dois modelos frente a origem do vAIG nas criações de subsistência.

Barrios et al. (2009) através de estudo epidemiológico realizado em granjas de subsistência no Estado de Minas Gerais, levantou questões pertinentes relacionadas as possíveis origens do vAIG no modelo de subsistência, sendo estas associadas através da transmissão oriundas de granjas industriais, onde se intensificou em áreas de grande densidade avícola, cuja referida condição propicia um maior potencial de transmissibilidade do vAIG nestes locais.

Outra possibilidade de introdução do vírus em granjas de subsistência seria através de utilização de vacinas vivas contaminadas com vAIG (Vacinas contra doença de Marek,

Newcastle, doença de Gumboro e Bronquite infecciosa), que contribuem para a prevalência e disseminação da infecção pelo vAIG em aves de granja industrial para aves de granjas de subsistência, visto que aves criadas no modelo rústico não são comumente vacinadas. Além disso, pode-se também relacionar através da utilização da própria vacina contra Anemia Infecciosa das Galinhas contaminada com vAIG vivo atenuado, comumente utilizado em matrizes industriais, sendo assim, apresentando um potencial risco para aves de subsistência, que são obtidas a partir de granjas industriais (MARIN et al., 2013).

Através deste estudo, pode-se observar que o vAIG circula tanto em granjas industriais quanto de subsistência no Estado do Rio de Janeiro, sendo possível obter-se um conhecimento relacionado as variações moleculares do vírus. Sendo desta forma, capaz de compreender como a inter-relação entre a biosseguridade, manejo e vacinação das aves podem contribuir de forma eficiente no sistema de produção avícola frente ao controle da AIG.

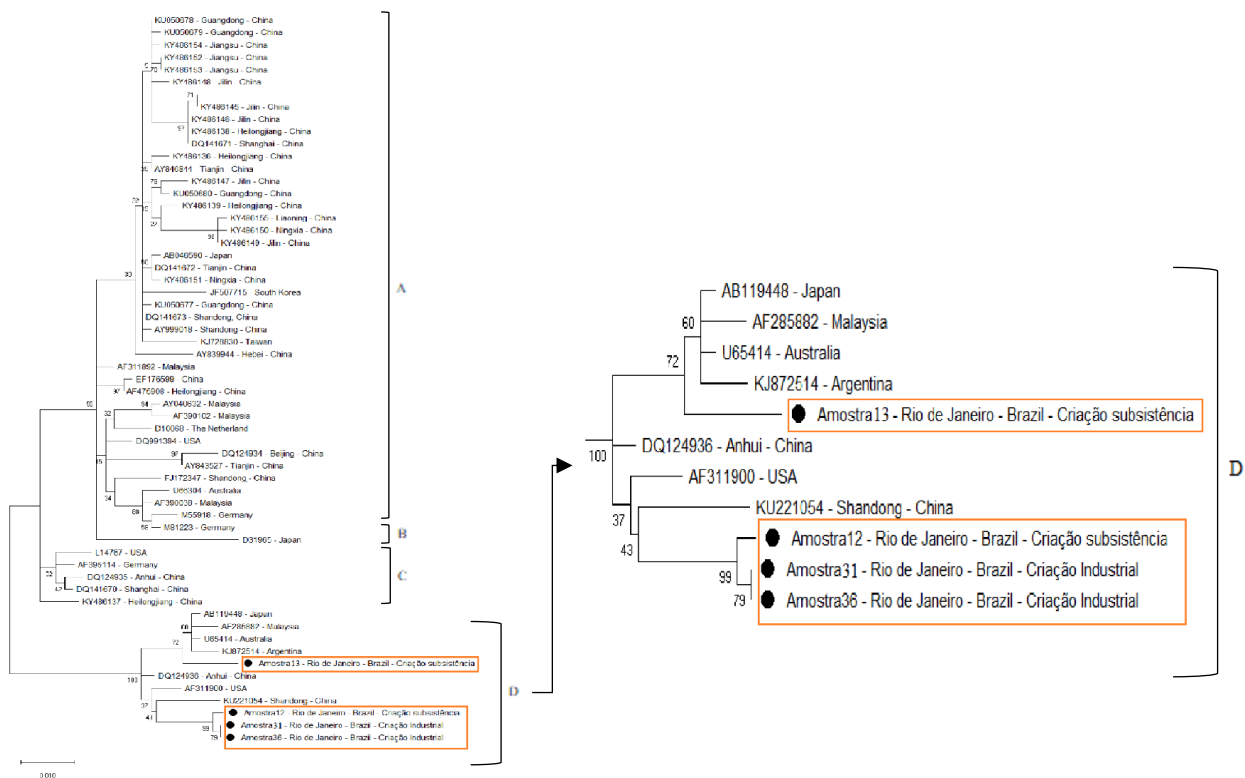


Figura 14. Análise filogenética inferida através do método “Maximum Likelihood”. Próximo aos braços da árvore, a porcentagem da associação dos táxons que agruparam é demonstrada pelo valor de “Bootstrap” (1000 pseudorréplicas). A distância evolutiva foi computada pelo método Kimura-2-parâmetros com G + I. A análise envolveu 54 sequências de nucleotídeos disponíveis no GenBank de diversas partes do mundo. Todas as posições contendo “gaps” e dados omissos foram eliminados. A análise evolutiva foi realizada através do MEGA X.

5 CONCLUSÕES

O vAIG circula em granjas de criação de subsistência e industrial no estado do Rio de Janeiro.

Os métodos de prevenção empregados nas granjas de criação industrial do estado do Rio de Janeiro não são eficientes para evitar a introdução do vAIG.

Os órgãos como o timo, baço e medula são os mais indicados para a realização de técnicas moleculares para a detecção do vAIG, tanto em frangos de corte criados em sistema de produção industrial como em granjas de criação de subsistência.

As cepas virais sequenciadas no presente estudo apresentam mutações por substituição identificadas apenas nas amostras estudadas no estado do Rio de Janeiro, quando comparado com amostras de outros países.

As cepas do vAIG que circulam nos dois sistemas de produção são filogeneticamente relacionadas, o que pode indicar uma origem em comum. Contudo, não se pode afirmar que as granjas de subsistência são fontes de infecção para as granjas de criação industrial.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal, Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/resumo>>. Acesso em 23 de junho de 2020.

ADAIR, B. M.; MCNEILLY, F.; MCCONNELL, C. D. G.; MCNULTY, M. S. Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus in experimentally infected chickens. **Avian Diseases**, p. 943-950, 1993.

ALLAN, G. M.; PHENIX, K. V.; TODD, D.; MCNULTY, M. S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus. **Journal of Veterinary Medicine, Series B**, v. 41, n. 1-10, p. 17-26, 1994.

AYRES, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. A. S.; AYRES-JUNIOR, M. BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. 2007.

BARRIOS, P. R.; MARÍN, S. Y.; RESENDE, M.; RIOS, R. L.; RESENDE, J. S.; HORTA, R. S.; COSTA, M. P.; MARTINS, N. R. S. Occurrence of chicken anaemia virus in backyard chickens of the metropolitan region on Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, Campinas, v.11, n. 2, Apr/June, 2009.

BRENTANO, L.; MORES, N.; WENTZ, I.; CHANDRATILLEKE, D.; SCHAT, K. A. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. **Avian diseases**, p. 793-800, 1991.

BRENTANO, L.; SILVA, B. D.; SAYD, S.; FLORES, S. W. Anticorpos para o vírus da Anemia das Galinhas (CAV) em matrizes de corte no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, 2:157-179, 2000.

BRENTANO, L. Anemia infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI JR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J. et al. (Eds). **Doenças de aves**. 2. ed. Campinas: FACTA - Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícola, p. 735-762, 2009.

BOX, P. G.; HOLMES, H.C.; BUSHAL, A. C.; FINNEY, P. M. Impaired response to killed Newcastle disease vaccine in chickens possessing circulating antibody to chicken anemia agent. **Avian Pathology**, 17(3): 713-723, 1988.

BULLOW, V.; SCHAT, K. A. Chicken infectious anemia. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW, McDougald LR, Saif YM, editors. **Diseases of poultry**. 10th ed. Ames: Iowa State University, p.739-756, 1997.

CALNEK, B. W.; LUCIO-MARTINEZ, B.; CARDONA, C.; HARRIS, R. W.; SCHAT, K. A.; BUSCAGLIA, C. Comparative susceptibility of Marek's disease cell lines to chicken infectious anemia virus. **Avian diseases**, p. 114-124, 2000.

CARDONA, C. J.; OSWALD, W. B. & SCHAT, K. A. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. **J. Gen. Virol.** 81:2067-2075, 2000.

- CIACCI-ZANELLA, J. R. C.; BRENTANO, L. Circoviridae, in: Flores, E.F., **Virologia Veterinária**, Santa Maria-RS, 2ed, Ed. Da UFSM, cap. 14, p. 419-437, 2012.
- CONG, F.; ZHU, Y.; WANG, J.; LIAN, Y.; LIU, X.; XIAO, L.; GUO, P. A multiplex xTAG assay for the simultaneous detection of five chicken immunosuppressive viruses. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 1, p. 347, 2018.
- CRAIG, M. I.; RIMONDI, A.; DELAMER, M.; SANSALONE, P.; KÖNIG, G.; VAGNOZZI, A.; PEREDA, A. Molecular characterization of chicken infectious anemia virus circulating in Argentina during 2007. **Avian diseases**, v. 53, n. 3, p. 331-335, 2009.
- CROWTHER, R. A.; BERRIMAN, J. A.; CURRAN, W, L.; ALLAN, G. M.; TODD, D. 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, n. 24, p. 13036-13041, 2003.
- DAVIDSON, I.; KEDEM, M.; BOROCHOVITZ, H.; KASS, N.; AYALI, G.; HAMZANI, E.; PERK, S. Chicken infectious anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. **Avian diseases**, v. 48, n. 1, p. 108-118, 2004.
- DEACON, N. J.; LAH, M. The potential of the polymerase chain reaction in veterinary research and diagnosis. **Australian veterinary journal**, v. 66, n. 12, p. 442-444, 1989.
- DEBOER, G. F.; VAN ROOZELAAR, D. J.; MOORMANN, R, J.; JEURISSEN, S. H. M.; VAN DEN WINGAARD, J. C.; HILBINK, F.; KOCH, G. Interaction between chicken anemia virus and live Newcastle disease virus vaccine. **Avian Pathology**, 23(2): 263-275, 1994.
- DHAMA, K.; KATARIA, K, M.; DASH, B. B.; SENTHILKUMAR, A.; TOMAR, S. A. Chicken Infectious Anemia (CIA): A Review. **Ind. J. Compo Microbiol. Immunol. Infect. Dis.**, 23: 1-15, 2002.
- DHAMA, K.; MAHENDRAN, M.; SOMVANSI, R.; CHAWAK, M. M. Chicken infectious anaemia virus: An immunosuppressive pathogen of poultry-A review. **Indian J. Vet. Pathol**, 32(2), 158-167, 2008.
- DUCATEZ, M. F.; OWOADE, A, A.; ABIOLA, J. O.; MULLER, C. P. Molecular epidemiology of chicken anaemia virus in Nigeria. **Arch Virol, Jan**, 151 (1) 97-111, 2006.
- ELTAHIR, Y. M.; QIAN, K.; JIN, W.; WANG, P.; QIN, A. Molecular epidemiology of chicken anemia virus in commercial farms in China. **Virology journal**, v. 8, n. 1, p. 145, 2011.
- ENGSTRÖM, B. E.; LUTHMAN, M. Blue wing disease of chickens: signs, pathology and natural transmission. **Avian Pathology**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 1984.
- FARKAS, T.; MAEDA, K.; SUGIURA, H.; KAI, K.; HIRAI, K.; OTSUKI, K.; HAYASHI, T. A serological survey of chickens, Japanese quail, pigeons, ducks and crows for antibodies to chicken anaemia virus (CAV) in Japan. **Avian Pathology**, v. 27, n. 3, p. 316-320, 1998.
- FARKAS, T.; TODD, D.; MCNULTY, M.S. Circoviridae: Poultry Diseases, editora Elsevier, 6ªed.cap. 34, pp. 398-404, 2008.

FEHLER, F.; WINTER, C. CAV infection in older chickens: an apathogenic infection. In: **Proceedings of 2nd International Symposium on Infectious Bursal Disease and Chicken Anemia, Institut für Geflügelkrankheiten, Justus Liebig University, Rauischholzhausen, Giessen.** p. 391-394, 2001.

FUSSEL, L. W. Poultry industry strategies for control of immunosuppressive diseases. **Poultry science**, v. 77, n. 8, p. 1193-1196, 1998.

FLORES, E. F. Virologia veterinária. **Santa Maria: UFSM**, p. 888, 2007.

GELDERBLOM, H.; KLING, S.; LURZ, R.; TISCHER, I.; BULLOW, V. V. Morphological characterization of chicken anaemia agent (CAA). **Archives of Virology**, New York, v.109, p. 115-120, 1989.

GORYO, M.; SUGIMURA, H.; MATSUMOTO, S.; UMEMURA, T.; ITAKURA, C. Isolation of an agent inducing chicken anaemia. **Avian Pathology**, v. 14, n. 4, p. 483-496, 1985.

GORYO, M.; SUWA, T.; MATSUMOTO, S.; UMEMURA, T.; ITAKURA, C. Serial propagation and purification of chicken anaemia agent in MDCC-MSB1 cell line. **Avian Pathology**, v. 16, n. 1, p. 149-163, 1987.

GORYO, M.; HAYASHI, S.; YOSHIZAWA, K.; UMEMURA, T.; ITAKURA, C.; YAMASHIRO, S. Ultrastructure of the thymus in chicks inoculated with chicken anaemia agent (MSB1-TK5803 strain). **Avian Pathology**, v. 18, n. 4, p. 605-617, 1989.

HAILEMARIAM, Z.; OMAR, R. A.; HAIR-BEJO, M.; GIAP, C. T. Detection and characterization of chicken anemia virus from commercial broiler breeder chickens. **Virol. J.** 5:128, 2008.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Ser**, 41:95-98, 1999.

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

HOOP, R. K. Transmission of chicken anaemia virus with semen. **Vet Rec**, 133:551-2, 1993.

HU, L. B.; LUCIO, B.; SCHAT, K. A. Depletion of CD4+ and CD8+ T lymphocyte subpopulations by CIA-1, a chicken infectious anemia virus. **Avian Diseases**, p. 492-500, 1993.

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

JEURISSEN, S. H. M.; WAGENAAR, F.; POL, J. M. A.; VAN DER EB, A. J.; NOTEBORN, M. H. M. Chicken anemia virus causes apoptosis of thymocytes after in vivo infection and of cell lines after in vitro infection. **J Virol**, 66:7383-8, 1992.

- KOCH, G.; VAN ROOZELAAR, D. J.; VERSCHUEREN, C. A.; VAN DER EB, A. J.; NOTEBORN, M. H. Immunogenic and protective properties of chicken anaemia virus proteins expressed by baculovirus. **Vaccine** 13 (8), 763–770, 1995.
- LAWSON, G.M. Defining limit of detection and limit of quantification as applied to drug of abuse testing: striving for a consensus. *Clinical Chemistry*, v.40, n.7, p. 453 - 454, jan 1994.
- LI, Y.; FANG, L.; CUI, S.; FU, J.; LI, X.; ZHANG, H.; ZHAO, P. Genomic characterization of recent chicken anemia virus isolates in China. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 401, 2017.
- LIEN, Y. Y.; HUANG, C. H.; SUN, F. C.; SHEU, S. C.; LU, T. C.; LEE, M. S. Development and characterization of a potential diagnostic monoclonal antibody against capsid protein VP1 of the chicken anemia virus. **Journal of veterinary science**, v. 13, n. 1, p. 73-79, 2012.
- LUCIO, B.; SCHAT, K. A.; SHIVAPRASAD, H. L. Identification of the chicken anemia agent, reproduction of the 205 disease, and serological survey in the United States. **Avian Dis**, 34:146-53, 1990.
- MARIN, S. Y. G.; BARRIOS, P. R.; RIOS, R. L.; RESENDE, M.; RESENDE, J. S.; SANTOS, B. M.; MARTINS, N. R. S. Molecular characterization of contaminating infectious anemia virus of chickens in live commercial vaccines produced in the 1990s. **Avian diseases**, v. 57, n. 1, p. 15-21, 2013.
- MARKOWSKI-GRIMSRUD, C. J.; MILLER, M. M.; SCHAT, K. A. Development of strain-specific real-time PCR and RT-PCR assays for quantitation of chicken anemia virus. **Journal of virological methods**, v. 101, n. 1-2, p. 135-147, 2002.
- MILES, A. M.; REDDY, S. M.; MORGAN, R. W. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. **Avian diseases**, p. 9-18, 2001.
- MILLER, M. M.; SCHAT, K. A. Chicken infectious anemia virus: an example of the ultimate host–parasite relationship. **Avian diseases**, v. 48, n. 4, p. 734-745, 2004.
- MCNEILLY, F.; SMYTH, J. A.; ADAIR, B. M.; MCNULTY, M. S. Synergism between chicken anemia virus (CAV) and avian reovirus following dual infection of 1-day-old chicks by a natural route. **Avian diseases**, p. 532-537, 1995.
- MCNULTY, M. S.; CONNOR, T. J.; MCNEILLY, F.; KIRKPATRICK, K. S.; MCFERRAN, J. B. A serological survey of domestic poultry in the United Kingdom for antibody to chicken anaemia agent. **Avian Pathology**, v. 17, n. 2, p. 315-324, 1988.
- MCNULTY, M. S.; CONNOR, T. J.; MCNEILLY, F.; TODD, D.; MAWHINNEY, K. A.; CREELAN, J.; MCLOUGH, M. F. Current status of chicken anaemia agent. In: **Western Poultry Diseases Conference**, p. 12-13. 1989.
- MCNULTY, M. S.; CONNOR, T. J.; MCNEILLY, F. Influence of virus dose on experimental anaemia due to chicken anaemia agent. **Avian Pathology**, v. 19, n. 1, p. 167-171, 1990.
- MCNULTY, M. S. Chicken anaemia agent: a review. **Avian Pathology**, v.20, n.2, p.187-203, 1991.

MCNULTY, M. S. Chicken anemia virus. In: Swain DE et al., eds. Isolation and Identification of Avian Pathogens, vierthe th Edition, Kennet Square: New Bolton Center, **American Association of Avian Pathologists**, p.146-149,1998.

NOGUEIRA, E. O.; BRENTANO, L.; FERREIRA, A. J. P. A VP3/VP1 gene polymerase chain reaction assay for detection of chicken anemia virus in broiler samples. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 131-140, 2005.

NOGUEIRA-DANTAS, E. O.; FERREIRA, A. J. P.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; BRENTANO, L. Cloning and expression of chicken anemia virus VP3 protein in Escherichia coli. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 30, n. 3, p. 133-142, 2007.

NOTEBORN, M. H.; DE BOER, G. F.; VAN ROOZELAAR, D. J.; KARREMAN, C.; KRANENBURG, O.; VOS, J. G.; KOCH, G. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. **Journal of virology**, v. 65, n. 6, p. 3131-3139, 1991.

NOTEBORN, M. H.; KRANENBURG, O.; ZANTEMA, A.; KOCH, G.; DE BOER, G. F.; VAN DER EB, A. J. Transcription of the chicken anemia virus (CAV) genome and synthesis of its 52-kDa protein. **Gene**, v. 118, n. 2, p. 267-271, 1992.

NOTEBORN, M. H. M.; TODD, D.; VERSCHUEREN, C, A, J.; DE GAUW, H. W. F. M.; VELDKAMP, S.; DOUGLAS, A. J. A single chicken anaemia vírus protein induces apoptosis. **J Virol**, 68(1):346–51, 1994.

NOTEBORN, M. H. M. Chicken anemia virus induced apoptosis: underlying molecular mechanisms. **Veterinary microbiology**, v. 98, n. 2, p. 89-94, 2004.

ONG, C. J.; DUTZ, J. P.; CHUI, D.; TEH, H. S.; MARTH, J. D. CD45 enhances positive selection and is expressed at a high level in large, cycling, positively selected CD4+ CD8+ thymocytes. **Immunology**, v. 91, n. 1, p. 95-103, 1997.

OTAKI, Y.; TAIIMA, M.; KATO, A.; NOMURA, Y. Depression of vaccinal immunity to Marek's disease by infection with chicken anemia agent. **Avian Pathology**, 17(2): 333-347, 1988.

OSOWSKI, G.; MORES, M.; JAENISCH, F.; BALDI, K.; ESTEVES, P. Hibridização in situ para detecção do vírus da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e girovírus aviário tipo 2 (AVG2). In: **Embrapa Suínos e Aves-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 8., 2014, Concórdia. Anais... Brasília: Embrapa, 2014. p. 65-66. JINC 2014., 2014.

PETERS, M. A.; CRABB, B. S.; WASHINGTON, E. A.; BROWNING, G. F. Site-directed mutagenesis of the VP2 gene of chicken anemia virus affects virus replication, cytopathology and host-cell MHC class I expression. **Journal of general virology**, v. 87, n. 4, p. 823-831, 2006.

POPE, C, R. Chicken anemia agent. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 30, n. 1, p. 51-65, 1991.

PHENIX, K. V.; MEEHAN, B. M.; TODD, D.; MCNULTY, M. S. Transcriptional analysis and genomic expression. of chicken anaemia vírus. **J Gen Virol**, 75:905-9, 1994.

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

RENSHAW, R. W.; SOINÉ, C.; WEINKLE, T.; O'CONNELL, P. H.; OHASHI, K.; WATSON, S. et al. A hypervariable region in VP1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture **J. Virol**, 70:8872-8878, 1996.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, P, J, A. **Patologia Aviária**. 1º edição. Barueri: Manole. p. 150-154, 2009.

ROSARIO, K.; BREITBART, M.; HARRACH, B.; SEGALÉS, J.; DELWART, E.; BIAGINI, P.; VARSANI, A. Revisiting the taxonomy of the family Circoviridae: establishment of the genus Cyclovirus and removal of the genus Gyrovirus. **Archives of Virology**, v. 162, n. 5, p. 1447-1463, 2017.

ROSENBERGER, J. K.; CLOUD, S. S. The isolation and characterization of chicken anemia agent (CAA) from broilers in the United States. **Avian Dis** 33:707-713. 1989.

ROSENBERGER, J. K.; CLOUD, S. S. Chicken anemia virus. **Poultry science**, v. 77, n. 8, p. 1190-1192, 1998.

RUTZ, F.; ROLL, V. F.; ANCIUTI, M. A.; XAVIER, E. G.; GENTILINI, F. P.; GONÇALVES, F. M. Nutrição qualidade carne de aves. **Energia**, v. 8, n. 00, 2011.

SANTOS, H. F.; KNAK, M. B.; DE CASTRO, F. L.; SLONGO, J.; RITTERBUSCH, G. A.; KLEIN, T. A. Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in Southern Brazil and The Netherlands. **Veterinary microbiology**, v. 155, n. 2-4, p. 230-236, 2012.

SAYEGH, C. E.; RATCLIFFE, M. J. Perinatal deletion of B cells expressing surface Ig molecules that lack V (D) J-encoded determinants in the bursa of Fabricius is not due to intrafollicular competition. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 5041-5048, 2000.

SIMIONATTO, S.; LIMA-ROSA, C. A. D. V.; RUBIN, L. L.; CANAL, C. W. Um protocolo de " nested-PCR" para detecção do vírus da anemia das galinhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 25, n. 2, p. 106-110, 2005.

SOINE, C.; WATSON, S. K.; RYBICKI, E.; LUCIO, B.; NORDGREN, R. M.; PARRISH, C. R.; SCHAT, K. A. Determination of the detection limit of the polymerase chain reaction for chicken infectious anemia virus. **Avian diseases**, p. 467-476, 1993.

SCHAT, K.A. Chicken infectious anemia. In Y.M. Saif, H.J. Barnes, J.R. Glisson, A.M. Fadly, L.R. McDougald & D.E. Swayne (Eds.). **Diseases of Poultry**. Ames, IA: Iowa State University Press. Smyth, J.A., (pp. 182202). Moffett, 2003.

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.

SMYTH, J. A.; MOFFETT, D. A.; MCNULTY, M. S.; TODD, D.; MACKIE, D. P. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chicken anemia virus infection at one day of age. **Avian diseases**, p. 324-338, 1993.

TECHERA, C.; TOMÁS, G.; PANZERA, Y.; BANDA, A.; PERBOLIANACHIS, P.; PÉREZ, R.; MARANDINO, A. Development of real-time PCR assays for single and simultaneous detection of infectious bursal disease virus and chicken anemia virus. **Molecular and cellular probes**, v. 43, p. 58-63, 2019.

TODD, D.; CREELAN, J. L.; MACKIE, D. P.; RIXON, F.; MCNULTY, M. S. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. **J. Gen. Virol.** 71, 819–823, 1990.

TODD, D.; CREELAN, J. L.; MCNULTY, M. S. Dot blot hybridization assay for chicken anemia agent using a cloned DNA probe. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 29, n. 5, p. 933-939, 1991.

TODD, D.; MAWHINNEY, K. A.; MCNULTY, M. S. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polymerase chain reaction. **Journal of clinical microbiology**, v. 30, n. 7, p. 1661-1666, 1992.

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

TODD, D.; SCOTT, A. N.; BALL, N. W.; BORGHMANS, B. J.; ADAIR, B. M. Molecular basis of the attenuation exhibited by molecularly cloned highly passaged chicken anemia virus isolates. **Journal of virology**, v. 76, n. 16, p. 8472-8474, 2002

TODD, D. Avian circovirus diseases: lessons for the study of PMWS. **Veterinary microbiology**, v. 98, n. 2, p. 169-174, 2004.

TORO, H.; VAN SANTEN, V. L.; LI, L.; LOCKABY, S. B.; VAN SANTEN, E.; HOERR, F. J. Epidemiological and experimental evidence for immunodeficiency affecting avian infectious bronchitis. **Avian Pathology**, v. 35, n. 6, p. 455-464, 2006.

THAM, K. M.; STANISLAWEK, W.L. Polymerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera. **Avian Dis.**, v.36, p.1000-1006, 1992.

VAN SANTEN, V. L.; KALTENBOECK, B.; JOINER, K. S.; MACKLIN, K. S.; NORTON, R. A. Real-time quantitative PCR-based serum neutralization test for detection and titration of neutralizing antibodies to chicken anemia virus. **Journal of virological methods**, v. 115, n. 2, p. 123-135, 2004.

VIELITZ, E.; VON BÜLOW, V.; LANDGRAF, H.; CONRAD, C. Anemia in broilers--development of a vaccine for breeder stock. **Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B**, v. 34, n. 8, p. 553, 1987.

VIELITZ, E.; LANDGRAF, H. Anaemia-dermatitis of broilers: Field observations on its occurrence, transmission and prevention. **Avian Pathology**, v. 17, n. 1, p. 113-120, 1988.

VIELITZ, E.; CONRAD, C.; VOSS, M.; VON BÜLOW, V.; DORN, P.; BACHMEIER, J.; LÖHREN, U. Vaccination against infectious anemia of poultry (CAA)--results of field studies. **DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 98, n. 4, p. 144-147, 1991.

ZHANG, X.; XIE, Q.; JI, J.; CHANG, S.; LIU, J.; CHEN, F.; BEE, Y. Complete genome sequence analysis of a recent chicken anemia virus isolate and comparison with a chicken anemia virus isolate from human fecal samples in China. **American Society for Microbiology (ASM)**, 2012.

ZHANG, X.; LIU, Y.; JI, J.; CHEN, F.; SUN, B.; XUE, C.; XIE, Q. Identification of a chicken anemia virus variant-related gyrovirus in stray cats in China, 2012. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

ZHUANG, S. M.; SHVARTS, A.; VAN ORMONDT, H.; JOCHEMSEN, A. G.; VAN DER EB, A. J.; NOTEBORN, M. H. Apoptin, a protein derived from chicken anemia virus, induces p53-independent apoptosis in human osteosarcoma cells. **Cancer research**, v. 55, n. 3, p. 486-489, 1995.

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

YILMAZ, H.; TURAN, N.; OZGUR, N, Y.; HELPS, C. R.; AKAY, O. Detection of chicken anemia virus DNA in the thymus of naturally infected chicks in Turkey. **Avian Dis.** 45:529-533, 2001.

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

YUASA, N.; TANIGUCHI, T.; GODA, M.; SHIBATANI, M.; IMADA, T.; HIHARA, H. Isolation of chicken anemia agent with MDCC-MSB1 cells from chickens in the field. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v. 23, n. 3, p. 75-77, 1983.

YUASA, N.; IMAI, K. Pathogenicity and antigenicity of eleven isolates of chicken anaemia agent (CAA). **Avian Pathology**, v. 15, n. 4, p. 639-645, 1986.