# UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE *NESTED*-PCR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA ANEMIA DAS GALINHAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE CEPAS BRASILEIRAS

**Simone Simionatto** 

Porto Alegre 2005

## UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL FACULDADE DE VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

# ESTABELECIMENTO DE UM PROTOCOLO DE *NESTED*-PCR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA ANEMIA DAS GALINHAS E ANÁLISE FILOGENÉTICA DE CEPAS BRASILEIRAS

Autor: Simone Simionatto

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na área de Medicina Veterinária Preventiva - Biologia Celular Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Wageck

Canal

PORTO ALEGRE 2005

#### S589e Simionatto, Simone

Estabelecimento de um protocolo de Nested-PCR para detecção do vírus da anemia das galinhas e análise filogenética de cepas brasileiras/ Simone Simionatto. – Porto Alegre: UFRGS, 2005.

- 69 f.; il. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, RS-BR, 2005. Cláudio Wageck Canal, Orient.
- Virologia veterinária : aves
   Patologia aviária
   PCR : aves
   Vírus : anemia : galinhas I. Canal, Cláudio Wageck, Orient. II. Título.

CDD 619.44105

Catalogação na fonte: Biblioteca da Faculdade de Veterinária da UFRGS

"O futuro pertence aqueles que acreditam na beleza de seus sonhos..."

Eleanor Roosevelt

À minha família e ao Rochélio pelo amor, carinho e, acima de tudo, por fazerem parte de minha vida.

#### **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela vida.

Ao Dr. Cláudio Wageck Canal pela oportunidade, orientação e confiança depositada.

Ao Dr. Carlos André da Veiga Lima-Rosa, pela co-orientação segura e competente dispensada. Pela amizade e exemplo de perseverança em alcançar os objetivos.

Ao Dr. Eliseu Binneck pela preciosa ajuda na realização deste trabalho, sem a qual, a análise filogenética certamente não seria como ela é. Pela amizade, incentivo e acima de tudo, pelo belo exemplo de profissionalismo.

A Profa. Ana Paula Ravazzolo, pelos ensinamentos e principalmente pela disposição em ajudar no que fosse preciso.

Aos meus amigos e colegas do laboratório: Cristiana, Josiane, Carla, Marisa, Clarissa, Laurício, Fabrício, Nilzane, Thales, André, Alfredo, Roberta, Laura, Márcia, Marina, Edna e Ubirajara pela amizade, respeito, auxílio e companheirismo, pelo ambiente agradável de trabalho e pela troca de idéias, sempre lucrativas, que fizeram com que eu chegasse até aqui.

As funcionárias Dona Orema, Ana Cristina e Alda pelo carinho e amizade.

As queridas amigas Adriana e Sibele, que mesmo à distância acompanharam cada etapa deste trabalho, sempre dispostas a colaborar e apoiar incondicionalmente.

As empresas avícolas pela disponibilidade das amostras biológicas.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela possibilidade de realização desta dissertação.

A todos os meus amigos que de alguma forma estiveram envolvidos nas metas e resultados alcançados.

#### **RESUMO**

O vírus da anemia das galinhas (CAV) pode causar imunodepressão em galinhas de todas as idades e doença nos frangos jovens, a qual é caracterizada por severa anemia, atrofia da medula óssea e hemorragias. A doença clínica é rara hoje, porém a forma subclínica é frequentemente encontrada em criações comerciais e resulta num considerável decréscimo do desempenho. O CAV apresenta variabilidade genética, entretanto, em relação às amostras brasileiras do CAV, pouco ou quase nada desta variabilidade é conhecida. O presente trabalho descreve um protocolo de Nested-PCR para a detecção do CAV diretamente de amostras clínicas e analisa filogeneticamente as sequências nucleotídicas das amostras positivas buscando verificar se a patologia apresentada por estas está relacionada com a variabilidade genética. Para a extração de DNA, o método baseado em tiocianato de guanidina mostrou-se mais eficiente e prático de executar que os demais testados. Foi selecionado um par de primers que amplifica uma região de 664 pb do gene vp1 e outro par que amplifica uma região interna de 539 pb para a realização da Nested-PCR. A especificidade dos primers foi avaliada utilizando amostras de lotes controlados para CAV e 30 diferentes isolados de vírus e bactérias causadoras de doenças em galinhas, as quais não geraram produto de amplificação. A sensibilidade foi determinada a partir de diluições seriadas da vacina comercial para o CAV. A Nested-PCR mostrou ser mais sensível do que a PCR e foi capaz de detectar 0,16 DICC<sub>50%</sub> da cepa vacinal. Além disso, a *Nested-PCR* detectou DNA viral em tecidos, soro e cama aviária de lotes com e sem sintomas clínicos. O produto de amplificação de 539 pb do gene *vp1* de 44 amostras, provenientes de diferentes Estados produtores de frangos do Brasil, foi sequenciado e foram encontradas 10 novas sequências nucleotídicas do CAV. Estas 10 sequências nucleotídicas foram analisadas filogeneticamente pelo método de distância neighbour joining com 1000 replicações o qual, mostrou que não houve correlação entre a patogenia apresentada nos animais e os grupos genéticos. Estas seqüências nucleotídicas também foram comparadas com 30 cepas de CAV isoladas em outros países e não foi observada correlação entre a distribuição geográfica e a variabilidade genética. Substituições de amino ácidos foram observadas em 9 posições sendo que, <sup>65</sup>R substituindo o resíduo Q e <sup>98</sup>F substituindo o resíduo Y ainda não haviam sido observadas. Conclui-se que, como técnica de detecção do CAV, o protocolo de Nested-PCR aqui descrito é mais sensível e menos trabalhoso do que o isolamento viral. As amostras Brasileiras de CAV possuem características filogenéticas similares às isoladas em outros países.

#### **ABSTRACT**

Chicken anemia virus (CAV) can cause immunosuppression in all birds and a disease in young chickens, characterized by severe anemia, bone marrow atrophy and hemorrhages. The clinical disease is rare today, but the subclinal form is frequently found in commercial flocks and result in measurably decreased performance. The genetic variability among the CAV was reported, but little is know about the Brazilian CAV samples. The present work reports a Nested-PCR protocol for detection of CAV directly from clinical specime. A phylogenic analysis of the nucleotide sequence obtained from the positive samples was carried out in order to evaluate if there was any relationship between the pathology of theses samples and the genetic variability. For DNA extraction, a method based on guanidine thiocyanate was found more sensitive and practical than other extraction protocols tested. The initial pair of primers used in the PCR assay targeted a 664 bp fragment on the vpl gene. The primers for the Nested-PCR assay targeted an internal fragment of 539 bp. The specificity of the primers was evaluated with samples of CAV from controlled flocks and 30 different viruses and bacteria isolated from chickens and those did not give rise to any amplification product. The sensitivity of the Nested-PCR was determined on serial dilutions of a CAV comercial vaccine. The Nested-PCR assay showed to be more sensitive than a one step PCR assay and was able to detect  $0.16 \text{ TCID}_{50\%}$  of the vaccine strain. In addition, the protocol employed here detected viral DNA from tissues, sera and litter from flocks with or without clinical symptoms. The 539 bp of vpl gene amplification products from the 44 field samples, deriving from different Brazilian geografic regions were sequenced and 10 new nucleotide sequences of CAV were found. These were analysed phylogenetic using maximum neighbour-joining distance methods, with 1000 bootstrap replications and did not show correlations between CAV pathology pattern and genetic groups. Also, these sequences were analysed together with 30 CAV sequences isolated in other countries and it was not observed correlation between geographical distribuition and genetic variability. Amino acid substitutions were detected at 9 positions of the Brazilian sequences and two of them were not observed before, <sup>65</sup>R replacing the Q residue and <sup>98</sup>F replacing Y residue. It is concluded that the Nested-PCR protocol described here is more sensitive and less cumbersome than virus isolation as a diagnostic technique for detection of CAV. Brazilian samples had similar phylogenetic characteristics to CAV isolated elsewhere.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	9
2 ARTIGOS CIENTÍFICOS	19
2.1 Um protocolo de "nested-PCR" para detecção do vírus da anemia das galinhas .	20
2.2 Caracterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anemia virus	43
3 CONCLUSÕES FINAIS	61
4 REFERÊNCIAS	62

## 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Nas últimas décadas, a avicultura brasileira ingressou em uma fase de expansão, resultante da incorporação de um avançado aporte tecnológico no que se refere à sanidade, genética, nutrição e manejo, consolidando-se como uma das atividades mais dinâmicas dentro do complexo agroindustrial do País.

O setor avícola absorve uma porcentagem expressiva da produção nacional de grãos, possibilita o desenvolvimento de novas regiões, proporciona o aumento da produção agrícola, favorece a fixação do agricultor no campo e, consequentemente, impulsiona o desenvolvimento interno do país.

A carne de frango é considerada mais saudável do que a carne vermelha, pois contém menos gordura saturada, a qual é apontada como responsável por problemas cardíacos. Seu consumo triplicou nos últimos 20 anos e, hoje, responde por 30% do consumo mundial, sendo a carne mais consumida (BIEGAI, 2004). A preferência pelas carnes brancas fez com que as empresas brasileiras exportadoras de carne de frango conquistassem novos mercados, gerando empregos e riquezas para o País.

Segundo a Associação Brasileira de Exportadores de Frango (ABEF, 2004) o Brasil é hoje o terceiro maior produtor mundial de carne de frango. A produção brasileira deste tipo de carne vem encontrando suporte para forte crescimento, ancorado sobre a elevação da demanda, tanto do consumo interno como das exportações (BIEGAI, 2004). Dados ainda preliminares indicam que em 2004 o Brasil assumice a liderança mundial na exportação de carne de frango e passou a responder por quase 40% do mercado internacional do produto. Há perspectivas que em 2005 as exportações aumentem de 10% a 15% em relação a 2004, consolidando o Brasil como o maior exportador mundial de carne de frango (ASGAV, 2004; DESOUZART, 2004). A cadeia produtiva avícola brasileira contribui com 2% do Produto Interno Bruto (PIB), movimentando cerca de 10 bilhões de dólares anualmente (MENDES, 2004).

No Rio Grande do Sul, a avicultura é responsável por cerca de 45 mil empregos diretos e 800 mil indiretos e constitui uma importante fonte de renda para 8,5 mil mini e pequenos produtores integrados (ASGAV, 2004).

Todavia, em função das modificações ocorridas no processo de criação em escala industrial, a ocorrência de agentes infecciosos tornou-se mais frequente, o que gerou a necessidade de pesquisas que objetivem a detecção e identificação dos patógenos presentes nestas criações, dentre eles o vírus da anemia das galinhas.

A denominação *chicken anemia agent* (CAA) persistiu por muitos anos. Entretanto, após a caracterização morfológica e bioquímica (GELDERBLOM et al., 1989; McNULTY et al., 1990; TODD et al., 1990) foi denominado de vírus da anemia das galinhas – CAV (*chicken anemia virus*) ou, vírus da anemia infecciosa das galinhas – CIAV (*chicken infectious anemia virus*) (GELDERBLOM et al., 1989; NOTERBORN et al., 1991). O Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus adotou a denominação CAV, porém ambas (CAV e CIAV) são encontradas na literatura.

O CAV foi isolado pela primeira vez no Japão (YUASA et al., 1979) e, desde então, sua presença tem sido descrita em quase todos os países com produção avícola (SCHAT, 2003), sendo que, no Brasil, seu isolamento inicial ocorreu em 1991 por Brentano et al. (1991).

Atualmente, são conhecidos quatro membros da família *Circoviridae*: o vírus da anemia das galinhas (MURPHY, 1996; PRINGLE, 1999), o vírus da doença das penas e bicos de psitacídeos (BFDV - BASSAMI et al., 1998; NIAGRO et al., 1998; ROY et al., 2003), o circovírus suíno (PCV; MEEHAN et al., 1997; MEEHAN et al., 1998) e o vírus TT (TTV) dos humanos. Este último tem sido identificado em doadores de sangue, sendo descrito como o primeiro circovírus humano identificado (MIYATA et al., 1999). PCV e BFDV pertencem ao gênero Circovírus, do qual o CAV fazia parte. O CAV difere dos Circovírus de suínos e de psitacídeos na antigenicidade, no genoma e no modo de replicação, sendo classificado como único membro do gênero gyrovírus (PRINGLE, 1999).

O virion do CAV não possui envelope e apresenta simetria icosaédrica com diâmetro de 25 nm (NOTEBORN et al., 1991). Seu genoma consiste de DNA circular fita simples com aproximadamente 2,3 kb, composto por uma região 5' não transcrita que contém a atividade promotora e três regiões codificadoras sobrepostas transcritas em um único mRNA fita simples. Três proteínas são traduzidas usando um sítio de iniciação alternativo (NOTEBORN et al., 1994b). A VP1 com 51,6 kDa é uma proteína encontrada no capsídeo com função estrutural (NOTEBORN & KOCH,

1995) e, juntamente com VP2, é capaz de induzir a formação de anticorpos neutralizantes. A VP2, com 24,0 kDa, além de servir como modelo estrutural (*scaffolding*) para a VP1, tem atividade de fosfatase e, acredita-se que também participe da indução de apoptose celular (NOTEBORN, 2004). A VP3, com 13,6 kDa, também chamada apoptina, induz apoptose celular, exercendo importante função na patogenia do CAV, pois sua ação resulta na depleção de linfócitos T e conseqüente imunodepressão (NOTERBORN et al., 1994a).

A doença é caracterizada por severa anemia, hemorragias, aplasia de medula óssea, retardo no crescimento, mortalidade de 10% a 20% (a qual pode chegar até 60%), atrofía generalizada de órgãos linfóides, imudepressão (SCHAT, 2003) e conseqüente aparecimento de infecções secundárias e oportunistas (CLOUD et al., 1992a, CLOUD et al., 1992b; 1993; MILES, et al., 2001). O desenvolvimento das lesões está relacionado com a necessidade do CAV em dividir as células durante a sua replicação. Estudos sugerem que os hemocitoblastos na medula óssea e os precursores de linfócitos T no timo são os principais alvos para a infecção do vírus. Sua destruição resulta em severa depleção de células mielóides e linfóides, resultando no surgimento da anemia, que é a característica principal da doença (SMYTH et al., 1993). Os hemocitoblastos, dentre outras células, dão origem aos trombócitos, e a redução desses está, provavelmente, relacionada com o aumento das hemorragias intramusculares (McNULTY, 1991). Células B e suas precursoras não são suscetíveis à infecção pelo CAV (ADAIR, 2000).

A infecção do CAV manifesta-se na forma clínica e subclínica, sendo que ambas são responsáveis por perdas econômicas. A doença clínica é dependente da idade de exposição ao vírus, da presença de anticorpos neutralizantes e da presença de infecções secundárias. Estudos indicam que variações genéticas entre as cepas do CAV também interferem na patogenia do vírus (SCOTT et al., 1999; YAMAGUCHI et al., 2001). A capacidade das linhagens de CAV induzir doença clínica está associada à capacidade destas infectarem e destruírem células na medula óssea (McKENNA et al., 2003). A habilidade de o sistema imune produzir anticorpos neutralizantes é controlada por um fator que impede a replicação viral antes do desenvolvimento das lesões. Galinhas imunologicamente maduras produzem anticorpos de maneira oportuna, depois da infecção com o CAV, prevenindo o desenvolvimento das lesões (HU et al., 1993, apud MILLER & SCHAT, 2004). Aves

em todas as idades são suscetíveis à infecção sendo que, os sinais clínicos manifestam-se quando esta acontecer nos primeiros dias de vida. Porém, aves com mais de 3 semanas de vida podem desenvolver lesões ou viremia persistente, quando o sistema imune é comprometido por outros patógenos como por exemplo, reovírus, vírus da doença da bolsa de Fabrícius ou vírus da doença de Marek. Nestes casos, ocorre destruição de linfócitos B, dificultando uma resposta imune efetiva contra o CAV (TODD, 2004).

A infecção subclínica geralmente ocorre em aves adultas, sendo esta a forma mais freqüente da doença. Todd (2004) relatou que apesar dos sintomas clínicos não terem sido induzidos, foram observadas lesões histológicas no timo de aves livres de patógenos específicos (SPF) inoculadas experimentalmente com 3 semanas de idade, sugerindo que a função das células T é afetada também na anemia subclínica. Em decorrência do comprometimento do sistema imune das aves, as infecções secundárias e oportunistas são potencializadas bem como, o decréscimo considerável na proteção conferida pelas vacinas. Além disso, a infecção pode causar perdas econômicas significativas como resultado do retardo no crescimento e aumento das condenações no abate (McNULTY et al., 1991; McLLROY et al., 1992; SOMMER & CARDONA, 2003).

McLlroy et al. (1992) relataram os efeitos econômicos da forma clínica da doença sobre a produtividade dos frangos de corte, concluindo que, nos lotes infectados, o rendimento foi 17% menor e a média de peso foi 3,3% menor que nos lotes não infectados e a mortalidade média foi de 2% maior nos lotes infectados pelo CAV. McNulty et al. (1991) demonstraram que o efeito econômico da forma subclínica da anemia infecciosa das galinhas em frangos de corte foi 13% menor no rendimento e 2,5% menor no peso médio das aves, quando comparados lotes afetados com lotes não afetados pelo vírus.

A transmissão do CAV pode se dar horizontalmente, por via oral de aves infectadas para aves suscetíveis (YUASA et al., 1980), ou verticalmente, da matriz para os ovos (CHETTLE et al., 1989). Davidson et al. (2004) descreveram que ambas as formas de transmissão foram responsáveis por perdas econômicas.

As matrizes infectadas durante o período de reprodução, não demonstram sinais clínicos, nem alterações na postura, fertilidade dos ovos e viabilidade

embrionária (BRENTANO et al., 2000). Até o momento, as galinhas parecem ser o único hospedeiro do vírus (TODD, 2004).

Um estudo de prevalência realizado no Brasil, englobando estados de produção comercial intensiva (RS, SC, PR, SP, MG, PE, PB e CE), indicou que 92% das matrizes pesadas testadas apresentaram anticorpos contra o CAV, demonstrando com isso a alta prevalência desse vírus na avicultura industrial brasileira (BENTRANO et al., 2000). Provavelmente isso seja reflexo da elevada resistência deste vírus à grande maioria dos tratamentos normalmente empregados, inclusive a fumigação com formol, usada em larga escala nas empresas avícolas. Este tratamento não tem capacidade de inativar completamente o CAV, permitindo que o mesmo persista por um longo período nas instalações (SCHAT, 2003).

Outro levantamento feito no Brasil, analisando 64 lotes de matrizes de corte não vacinadas (1439 soros) e 12 lotes de aves vacinadas (270 soros) demonstrou que a prevalência de matrizes pesadas com anticorpos para o CAV, na Região Sul do Brasil, foi de 89%. Verificou também que 100% dos lotes de matrizes analisados tiveram pelo menos uma ave soro positiva reforçando a alta prevalência e distribuição do vírus no Brasil (CANAL et al., 2004).

Para imunização de matrizes pesadas, vem sendo utilizada uma vacina atenuada. Este manejo é usado como forma de controle da forma clínica da doença na sua progênie, uma vez que se baseia na transferência de imunidade passiva para a progênie. Até pouco tempo acreditava-se que a doença podia ser controlada, desde que as matrizes desenvolvessem imunidade adequada, mediada por anticorpos neutralizantes, antes do início do período de postura. Desta maneira, as matrizes transfeririam para o ovo anticorpos em níveis suficientes para prevenir a infecção da progênie no período suscetível, reduzindo assim a ocorrência de surtos da doença. Porém, estudos recentes indicam que a imunidade humoral não previne a transmissão vertical. Este modelo, proposto primeiramente por Cardona et al. (2000) sugere que o vírus pode persistir em tecidos reprodutivos por longos períodos mesmo depois de ter havido a soroconversão. A detecção do vírus em embriões provindos de matrizes com anticorpos para o CAV indicou que o mesmo pode ser transmitido verticalmente de matrizes imunocompetentes. Miller et al. (2003) e Brentano et al. (2005) demonstraram que matrizes com altos títulos de anticorpos para CAV transmitem verticalmente o DNA do CAV e que o vírus pode permanecer latente em lotes de

criações comerciais. Entretanto, ainda não se sabe se o DNA é transferido como partícula viral infectiva capaz de induzir doença clínica na progênie. Sommer & Cardona (2003) também sugeriram que o vírus latente pode estar presente em frangos de corte com anticorpos maternos para o CAV. Neste caso, o potencial de latência pode ter conseqüências importantes no controle da doença em lotes de criações comerciais. Estes achados indicam o estabelecimento de latência do CAV no trato reprodutivo destes animais ou, alternativamente, uma baixa replicação viral que impediria a resposta imune.

O RNA viral está presente somente durante alguns dias do desenvolvimento embrionário, os quais correspondem aos dias do desenvolvimento de órgãos reprodutivos primários e secundários. Porém, não se sabe ainda se proteínas virais são produzidas neste período. Durante a latência ou em exposições com baixas doses virais, a atividade transcricional do CAV pode ser ativada num estágio específico do desenvolvimento embrionário, permanecendo no estado quiescente depois da formação inicial destes órgãos e sendo reativados durante a maturidade reprodutiva. Este modelo pode explicar a ocorrência da soroconversão na maturidade reprodutiva em lotes SPF (MILLER & SCHAT, 2004).

Recentemente foi demonstrado que o promotor gênico do CAV possui uma forte expressão basal em vários tipos de células. A região promotora é formada por quatro ou cinco repetições diretas em tandem (DR) contendo um inserto de 12 pb depois das duas primeiras DRs, indispensável para uma replicação eficiente (NOTEBORN et al., 1991; NOTEBORN et al., 1994b). A regulação da transcrição é complexa e consiste na interação da regulação positiva e negativa, as quais podem ser influenciadas *in vivo* por mudanças sutis no equilíbrio hormonal (MILLER & SCHAT, 2004). Em casos de baixa quantidade de amostras de DNA viral, a transcrição do CAV é controlada pela presença de receptores nucleares ativos que agem como indutores ou repressores da transcrição. Mudanças no equilíbrio entre repressores e indutores podem induzir a reativação da replicação viral, havendo soroconversão e formação de anticorpos neutralizantes, os quais servem como sinal para término da replicação (van SATEN et al., 2004). Um mecanismo de controle da transcrição similar foi demonstrado para outros promotores virais como por exemplo o SV40 (MILER & SCHAT, 2004).

Estudos sorológicos demonstram a existência de isolados de CAV com implicações clínicas similares, mas antigenicamente distintos. Embora estas diferenças afetem o tropismo celular *in vitro* (SPACKMAN et al., 2002a; SPACKMAN et al., 2002b), até o momento todos os isolados pertencem a um único sorotipo (SCHAT, 2003). Renshaw et al. (1996) ao identificar a região hipervariável da VP1, sugeriu que algumas mudanças nesta região poderiam influenciar o aumento da replicação viral e a propagação em células. Alterações em alguns aminoácidos desta proteína provocam atenuação das linhagens de CAV (TODD et al., 2002), as quais provavelmente estejam envolvidas na indução da doença subclínica. Múltiplas passagens do CAV em cultura celular podem induzir a atenuação de algumas cepas, como indicado através da redução da patogenia, decorrentes da substituição de um aminoácido nas posições 89 (SCOTT et al., 1999) e 394 (YAMAGUCHI et al., 2001) da VP1. Estudos preliminares indicam que algumas linhagens de galinhas as quais diferem em algumas características genéticas, também estão envolvidas na suscetibilidade do CAV em induzir a doença (ADAIR, 2000).

O diagnóstico da infecção pelo CAV é feito através do isolamento do vírus, da detecção de anticorpos ou ainda, pela amplificação de genes específicos. A possibilidade de isolar e cultivar os patógenos microbianos *in vitro* representou um dos maiores triunfos do diagnóstico, mas apesar de seu valor, possui algumas limitações. O tempo requerido para o cultivo normalmente varia de dias a semanas e testes definitivos podem ser realizados somente após sub-cultivos, o que introduz uma perda de tempo adicional. O crescimento em meio artificial por si só resulta de uma pressão de seleção que nem todos os microrganismos são capazes de ultrapassar. Além disso, algumas cepas do CAV não replicam em cultura celular devido a diferenças genéticas (ISLAM et al., 2002), podendo gerar resultados falsos negativos.

A detecção de anticorpos pode ser feita através de testes de ELISA, vírus neutralização (VN) e imunoflorescência indireta (IFA) (SCHAT, 2003). No entanto, a necessidade da contínua passagem do vírus em cultivo celular e a dificuldade na interpretação dos resultados, torna estes testes muito trabalhosos para serem utilizados em amplos estudos sorológicos. A VN é uma técnica bastante sensível para detectar anticorpos. Porém, é uma técnica cara e os resultados demoram em torno de 3 semanas para serem obtidos, inviabilizando seu uso em estudos mais extensos

(SCHAT, 2003). Devido à possibilidade de automação do ELISA, algumas avaliações foram desenvolvidas e apresentaram uma boa correlação com os testes padrões de IFA e VN (TODD et al., 1990; LAMICHHANE et al., 1992). Desde então, esta técnica vem sendo preconizada para diagnóstico sorológico da anemia infecciosa das galinhas.

As técnicas de diagnóstico baseadas em biologia molecular constituem uma avançada e promissora ferramenta para detecção de patógenos. A amplificação de ácidos nucléicos não é limitada pela capacidade do organismo crescer em cultura. Além disso, a caracterização do amplicom pode prover importantes informações epidemiológicas e evolutivas dos patógenos. Assim, testes de diagnóstico para detecção do CAV por PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase) vem sendo descritos.

Todd et al. (1992) descreveram a detecção do DNA do CAV por PCR a partir de 14 isolados originários de sete países. O fragmento amplificado compreendia 675 pb do gene que codifica para a VP1 e foi submetido a uma análise de restrição enzimática. Foi observado que os isolados de diferentes países geralmente apresentavam sítios de restrição enzimática distintos. Tham & Stanislawek (1992) investigaram a presença do CAV em sete casos com suspeita de anemia através do isolamento viral e amplificação do DNA em tecidos e soro. Cinco amostras de DNA extraído de tecidos foram positivas na PCR, porém o isolamento foi possível em somente 4 casos. Imai et al. (1998) desenvolveram uma Nested-PCR (PCR que visa amplificar um fragmento interno a partir de um produto já amplificado) que demonstrou ser até 100 vezes mais sensível que a PCR, o que permitiu a amplificação do DNA do CAV em tecidos fixados ou não em formalina. Visando estudar a transmissão vertical do CAV, Cardona et al. (2000) investigaram a presença deste agente em tecidos reprodutivos de aves SPF através de uma Nested-PCR. Foi observado que o DNA viral permanece em órgãos reprodutivos de matrizes e reprodutores por longos períodos, independente do título de anticorpos apresentados por estes animais. Yilmaz et al. (2001) amplificaram um fragmento de 298 pb do gene que codifica para a VP3 a partir de timos provenientes de frangos de corte clinicamente enfermos, buscando investigar a frequência da infecção do CAV na Turquia. A detecção do DNA foi associada também à presença de sinais clínicos e lesões características da doença.

Embora o genoma do CAV apresente variabilidade genética limitada, a filogenia deste agente vem sendo objeto de estudo, visando esclarecer a relação existente entre as cepas prevalentes nos diferentes países criadores de frango. Van Santen et al. (2001) caracterizaram 14 cepas de CAV presentes em 10 amostras clínicas obtidas de criações comerciais de frangos de corte no estado do Alabama (EUA). Este grupo observou que há uma diferença considerável entre as seqüências nucleotídicas da VP1 destas 14 cepas, porém em nível de aminoácidos esta diferença diminui para menos da metade, sendo que a maior divergência encontrada entre elas foi de 2,8%. Estas 14 cepas, quando submetidas à análise filogenética com outras 10 cepas identificadas em 4 diferentes países, não formaram grupos distindos, demonstrando que estas sequências não são mais similares entre si do que com os demais isolados. Em Bangladesh, Islam et al. (2002) detectaram uma cepa de CAV em amostra clínica, a qual foi submetida à análise filogenética da sequência nucleotídica e de aminoácidos da VP1, juntamente com outras doze descritas na literatura. A árvore filogenética resultante não revelou grupos distintos entre as sequências isoladas em diferentes países. Já a árvore resultante da sequência de amino ácidos apresentou três grupos, porém não houve relação geográfica entre os isolados de cada grupo. Recentemente, Chowdhury et al. (2003) demonstraram que a análise filogenética de isolados com baixas e altas passagens em cultura celular são altamente divergentes e apresentam diferenças consideráveis na patogenicidade.

Dada a importância do CAV no cenário mundial de produção de frangos, especialmente no que diz respeito às perdas econômicas decorrentes de infecções subclínicas, torna-se cada vez mais relevante e necessária a implementação de técnicas que visem à sua detecção, bem como da identificação das características moleculares envolvidas na patogenia das cepas prevalentes nas criações avícolas. O desenvolvimento e utilização de uma técnica mais prática e sensível de detecção do CAV permitirá a geração de dados fundamentais para uma melhor avaliação da presença deste agente entre os plantéis, visando a elaboração de estratégias de controle mais eficientes.

Dentro deste contexto, vem-se trabalhando no sentindo de testar métodos que propiciem um diagnóstico mais rápido e acurado da infecção pelo CAV, bem como caracterizar as cepas prevalentes no Brasil. Num primeiro momento, este trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade e especificidade de um protocolo de

Nested-PCR para a detecção do CAV em amostras de origem avícola. Posteriormente, restringiu-se a pesquisa ao seqüenciamento das amostras positivas na Nested-PCR, propiciando o estudo da variabilidade genética e da filogenia das cepas brasileiras, bem como das que melhor representam os diferentes isolados conhecidos.

## 2 ARTIGOS CIENTÍFICOS

2.1 Um protocolo de "nested-PCR" para detecção do vírus da anemia das galinhas

Trabalho aceito para publicação na Revista Pesquisa Veterinária Brasileira.

Um protocolo de "nested-PCR" para detecção do vírus da anemia das galinhas<sup>1</sup>.

A "nested-PCR" protocol for detection of chicken anemia virus<sup>1</sup>.

Simone Simionatto<sup>2</sup>, Carlos André da Veiga Lima-Rosa<sup>3</sup>, Lauricio Librelotto Rubin<sup>2</sup>,

Cláudio Wageck Canal<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Submetido em novembro de 2004 e aceito para publicação em dezembro de 2004.

<sup>2</sup>Laboratório de Virologia, Departamento de Patologia Clínica Veterinária, Faculdade de Veterinária (FAVET), UFRGS, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS, Brasil, 91540-000. <sup>3</sup>Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Autor correspondente. Endereço para correspondência: Porto Alegre RS Brasil CEP 91 540 000. E-mail: <a href="mailto:claudio.canal@ufrgs.br">claudio.canal@ufrgs.br</a>

ABSTRACT.- Simionatto S., Lima-Rosa C.A.V., Rubin L.L., Canal C.W. 2004. [A nested-PCR protocol for detection of chicken anemia virus.] Estabelecimento e padronização de um protocolo de "nested-PCR" para a detecção do vírus da anemia das galinhas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* XX(X):XX-XX. Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9090, Porto Alegre, RS 91540-000, Brasil. E-mail: claudio.canal@ufrgs.br

The present work reports a nested polymerase chain reaction (nested-PCR) protocol for detection of chicken anemia virus (CAV), the agent of infectious chicken anemia. For DNA extraction from clinical samples, a method based on guanidine thiocyanate was found more sensitive and practical than other extraction protocols tested. The pair of primers used in the initial PCR targeted a 664 bp fragment on the VP1 gene. The primers for the internal PCR targeted a fragment of 539 bp. The specificity of the primers was evaluated on samples of CAV controlled flocks. Thirty different viruses and bacteria isolated from chickens did not give rise to any amplification product in the assay. The sensitivity of the nested-PCR was determined on serial dilutions of a CAV vaccine. The nested-PCR was more sensitive than a one step PCR and was able to detect at least 0.16 TCID<sub>50</sub> of the vaccine strain. In addition, the protocol employed here detected viral DNA from tissues, sera and litter from flocks with or without clinical signs of disease. It is concluded that the nested-PCR protocol described here is more sensitive, faster and less cumbersome than virus isolation in cell culture as a diagnostic technique for detection of CAV.

**Index terms:** chicken anemia virus, CAV, molecular diagnosis, nested-PCR.

**RESUMO.-** Este trabalho descreve o estabelecimento de um protocolo de "nested-PCR" para a detecção do vírus da anemia das galinhas (CAV, chicken anemia virus), agente da anemia infecciosa das galinhas. Para a extração de DNA a partir de amostras clínicas um método baseado no uso de tiocianato de guanidina mostrou-se mais sensível e prático, do que os demais avaliados. Para a PCR inicial foi selecionado um par de *primers* que amplifica uma região de 664 pares de bases (pb) do gene VP1. Para a "nested-PCR" propriamente dita, foi selecionado um segundo par que amplifica uma região interna de 539 pb. A especificidade dos primers foi avaliada utilizando amostras de lotes controlados para CAV. Outras trinta amostras de vírus e bactérias, causadoras de doenças em aves, não geraram produto de amplificação. A sensibilidade do teste foi determinada a partir de diluições seriadas de uma amostra vacinal de CAV. A "nested-PCR" mostrou ser mais sensível do que a PCR e foi capaz de detectar pelo menos 0,16 DICC<sub>50%</sub> da cepa vacinal. Além disso, detectou DNA viral em tecidos, soro e cama aviária de lotes com e sem sinais clínicos. Conclui-se que, como técnica para a detecção do CAV, o protocolo de "nested-PCR" aqui descrito, é mais sensível, rápido e menos trabalhoso do que o isolamento viral em cultivo celular.

**Termos de indexação**: vírus da anemia das galinhas, CAV, virologia, diagnóstico molecular, "nested-PCR".

## INTRODUÇÃO

O vírus da anemia das galinhas (CAV) pertence à família *Circoviridae* (Murphy 1996) gênero *Gyrovirus* (Pringle 1999). Este vírus foi isolado pela primeira vez no Japão em 1979 (Yuasa et al. 1979). Desde então, sua presença tem sido descrita em criações comerciais em quase todo o mundo (Schat 2003). O genoma do CAV é composto de DNA circular de fita simples com aproximadamente 2,3 kb, possuindo três regiões codificadoras sobrepostas para a VP1 (51,6 kDa), VP2 (24,0 kDa) e VP3 (13,6 kDa) (Noteborn et al. 1991).

A transmissão do CAV se dá horizontalmente, de aves infectadas para aves suscetíveis (Yuasa et al. 1980) e verticalmente, de ovos provenientes de aves infectadas tanto soronegativas (Chettle et al. 1989) quanto na presença de altos níveis de anticorpos neutralizantes (Brentano et al. 2005). Por afetar células do sistema imune, particularmente hemocitoblastos da medula óssea e precursores de linfócitos T no timo, a imunodepressão decorrente favorece o surgimento de infecções secundárias oportunistas e falhas vacinais (Adair 2000).

Galinhas em todas as idades são suscetíveis à infecção, porém os sinais clínicos manifestam-se quando esta acontece nos primeiros dias de vida. A infecção subclínica é a forma mais freqüente da doença, sendo responsável pelo aumento do índice de conversão alimentar e diminuição do peso médio, causando prejuízos ao produtor (McNulty et al. 1991).

O diagnóstico de infecções pelo CAV é realizado através do isolamento viral, detecção de anticorpos ou identificação de segmentos do genoma (Schat 2003). Além de o isolamento viral apresentar baixa sensibilidade (Cardona et al. 2000), diferenças genéticas interferem na replicação do vírus (Renshaw et al. 1996) o que impossibilita

o isolamento de algumas cepas (Islam et al. 2002). Já os testes sorológicos indicam uma exposição prévia ao vírus e não uma infecção presente (Schat 2003).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica molecular que permite a detecção do DNA do CAV de forma rápida e econômica, tendo sido descritos protocolos de PCR que detectam o DNA viral a partir de tecidos e soro de aves, assim como de cultivos celulares e (Todd et al. 1992, Tham & Stanislawek 1992, Imai et al. 1998, Cardona et al. 2000, Yilmaz et al. 2001). Alguns pesquisadores, entretanto, somente obtiveram sucesso à amplificação do DNA do CAV quando as aves apresentavam sinais clínicos (Davidson et al., 2004). O presente trabalho descreve um protocolo de "nested-PCR" de alta sensibilidade, capaz de detectar o DNA viral em tecidos, soro e cama aviária, de lotes com e sem sinais clínicos da infecção.

### MATERIAL E MÉTODOS

#### Infecção Experimental

Pintos de ovos livres de patógenos específicos (SPF; Granja Rezende, MG) com seis dias de vida foram divididos em dois grupos de 12 animais. O grupo controle negativo (Grupo A) recebeu 0,2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,15 M NaCl, 0,01 M Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) por via intramuscular. Neste mesmo dia, pintos em outro grupo (grupo B) foram inoculados com 0,2 mL da vacina Nobilis CAV P4 (Intervet International, Holanda), partida 004/03, com 10<sup>2,3</sup> doses infectantes para 50% dos cultivos celulares (DICC<sub>50%</sub>), por via intramuscular. A vacina foi reconstituída em 200 mL de diluente específico, conforme instruções do fabricante.

#### **Amostras**

Os animais (inoculados e controles) foram sacrificados aos 0, 2, 4, 14, 21 e 28 dias após a inoculação. Em cada coleta, 2 animais de cada grupo foram sacrificados, sendo coletadas amostras de timo, baço, fígado, medula óssea, bolsa de Fabrício e sangue/soro. A determinação do método de extração de DNA mais adequado foi, inicialmente, realizada com fragmentos de órgãos e tecidos dos animais inoculados. A seguir, foram testados amostras de cama aviária, órgãos e soros de galinhas de diferentes lotes provenientes das empresas responsáveis por mais de 90% da produção de carne de frangos da Região Sul do Brasil. Soros de frangos de corte sem anticorpos para CAV e os soros de matrizes com anticorpos para CAV foram obtidos como descrito por Rubin et al. (2003) e Canal et al. (2004), respectivamente. Como controle negativo, foram utilizadas amostras provenientes de dois lotes de reprodutoras avós, negativos para a presença de anticorpos contra o CAV durante todo o seu ciclo de vida, como monitorado através de um kit de ELISA comercial. Na Tabela 1 estão discriminados o número e o tipo de amostras analisadas.

#### Extração de DNA

Quatro diferentes protocolos de extração de DNA foram testados: 1) extração com brometo de cetil trimetil amônia/cloreto de sódio (CTAB/NaCl); 2) extração com fenol/clorofórmio (Sambrook & Russell 2001); 3) extração com dodecil sulfato de sódio /EDTA (Hirt 1967); 4) extração com tiocianato de guanidina (adaptado de Rademaker & Bruijn, 1997). Cada protocolo foi testado sobre 200 μL de soro ou 20 mg de órgãos (timo, fígado, baço, bolsa de Fabrício e medula óssea), coletados dos animais inoculados experimentalmente. Os tecidos foram macerados em 200 μL

de TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0) em tubo Eppendorf de 1,5 mL, com o auxílio de um palito de madeira. Das amostras de cama aviária, foram utilizados 200 μL de uma solução contendo 0,5 g de cama ressuspendida em 5 mL de TE. Após a avaliação dos distintos protocolos de extração de DNA, optou-se pelo método baseado na extração com tiocianato de guanidina (Rademaker & Bruijn, 1997), adaptado como segue. Tecidos ou soro foram colocados em um tubo Eppendorf com 500 μL de solução GES (5 M de tiocianato de guanidina, 0,03 M de N-lauroil sarcosine, 1mM EDTA), sendo o tubo agitado levemente e incubado à 4 °C por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 250 μL de acetato de amônia 7,5 M, sendo o tubo novamente agitado suavemente e incubado a 4°C por 5 minutos. Após, foram adicionados 500 μL de fenol clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), submetendo o tubo a agitação vigorosa e centrifugação a 10.000 x g por 10 minutos. O DNA foi então precipitado com 380 μL de isopropanol e lavado com 500 μL de etanol 80%. O sedimento foi ressuspenso em 100 μL de TE e estocado a –20 °C até ser utilizado na PCR.

#### **Primers**

Com a ajuda do programa Vector NTI<sup>TM</sup> *Suite* 8.0 (InforMax Inc. 2002), foram selecionados dois pares de *primers* a partir do alinhamento de todas as seqüências de DNA do CAV disponíveis no GenBank® no final do ano de 2002. Os *primers* CAV7 (5'TTTCGACATCGGAGGAGACAGG3'), correspondendo aos nucleotídeos 925 à 948 e CAV8 (5'CCTTTTCGCCACCGGTTCTGGT3'), aos nucleotídeos 1577 à 1589 do genoma da cepa Cux-1 (GenBank acesso número M81223), foram usados na PCR inicial, objetivando a amplificação de um segmento de 664 pares de bases (pb)

do gene *vp*1; os primers CAV9 (5'CGTATAGTGTGAGGCTGCCG3'), correspondendo aos nucleotídeos 978 à 998 e CAV10 (5'GAGAGAAGACTCGCCACGG3') aos nucleotídeos 1498 à 1517 do genoma da mesma cepa, foram usados na "nested-PCR", objetivando a amplificação de um produto de 539 pb do mesmo gene.

#### Reações de amplificação

A PCR inicial foi realizada em um volume final de 25 μL contendo aproximadamente, 100 ng de DNA molde, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada nucleotídeo, 20 ρmol de cada primer e 0,5 unidades de *Taq* DNA Polimerase (Cenbiot, Porto Alegre, Brasil). A amplificação foi executada em um termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Perkin Elmer Instruments, EUA). A reação foi realizada com um ciclo de desnaturação inicial (94 °C, 5 min), seguido por 25 ciclos de desnaturação (94 °C, 1 min), anelamento (64 °C, 1 min) e extensão (72 °C, 1 min). Após, foi realizado um ciclo de extensão final (72 °C, 7 min).

Para a "nested-PCR", foram utilizados 30 ciclos com temperatura de anelamento de 54°C por 1 min. As demais condições foram iguais às da PCR inicial.

A eletroforese dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose 1,2% corado com 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio.

#### Sensibilidade e especificidade das reações de amplificação

A sensibilidade da "nested-PCR" foi determinada através de diluições seriadas (de base 10) da vacina Nobilis CAV P4 (Intervet International, Holanda). Este procedimento foi repetido cinco vezes de forma independente. A especificidade foi

determinada usando 15 soros de reprodutoras avós negativas para CAV e 30 diferentes amostras de vírus e bactérias causadoras de doenças em aves dos seguintes agentes: 1 cepa do vírus da laringotraqueite (Beltrão et al., 2004), 5 cepas do vírus da bronquite infecciosa, 4 cepas do vírus da doença infecciosa da bolsa, 6 cepas do vírus da doença de Newcastle, 1 cepa de pneumovírus e 1 cepa do vírus da bouba aviária (obtidos de vacinas comerciais); e 12 amostras de bactérias sendo uma amostra de cada de Ornithobacterium rhinotracheale (Canal et al. 2003), Pasteurella multocida, Haemophilus sp., Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae, Salmonella enteritidis, Salmonella gallinarum, Salmonella pullorum, Salmonella typhimurim, Reimerella anatipestipher, Bordetella bronchiseptica e Escherichia coli. Estas últimas bactérias foram isoladas e cedidas gentilmente pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária da UFRGS (CDPA).

Utilizou-se, em cada amplificação, um controle positivo (vacina CAV P4), um controle negativo (soro de reprodutoras avós negativas para CAV), e um contendo todos os reagentes da amplificação, exceto o DNA molde.

#### Sequenciamento

Os produtos de amplificação da "nested-PCR" dos animais inoculados experimentalmente foram seqüenciados, bem como os amplicons obtidos da PCR com a amostra vacinal utilizada na inoculação experimental. Os produtos de amplificação foram purificados com GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Suécia). Ambas as fitas foram seqüenciadas usando 30 ng do produto da "nested-PCR", 2,8 pmol de cada *primer*, utilizando o Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, EUA), conforme instruções do fabricante. O seqüenciamento do DNA foi realizado em um

seqüenciador automático ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, EUA). Os resultados do seqüenciamento foram verificados com a ajuda do programa Chromas, versão 1.45 (McCarthy 1996-1998). As seqüências foram alinhadas com as seqüências de CAV depositadas no GenBank com o auxílio do programa Clustal X (Thompson et al. 1997).

#### **RESULTADOS**

Quatro métodos de extração de DNA foram testados, buscando comparar a capacidade destes em obter DNA de CAV capaz de ser amplificado através da "nested-PCR". Todos os métodos testados foram capazes de gerar o produto de amplificação esperado. Contudo, o DNA extraído pelo protocolo descrito por Hirt (1967) gerou algumas bandas inespecíficas na "nested-PCR". Os protocolos fenol/clorofórmio e CTAB/NaCl (Sambrook & Russell 2001) geraram um produto de amplificação nítido, porém, com intensidade menor do que o produzido pelo protocolo que utiliza tiocianato de guanidina adaptado de Rademaker & Bruijn (1997). Este último foi selecionado para os ensaios posteriores.

Não foi possível visualizar produtos de amplificação na primeira amplificação (PCR) após a eletroforese em gel de agarose (resultados não mostrados). A "nested-PCR" realizada com as amostras clínicas dos animais do grupo B (vacinados) gerou um produto de amplificação com tamanho aproximado de 539 pb (Figura 1) em todas as coletas e em todos os órgãos testados. Entretanto, o mesmo produto de amplificação foi observado em amostras de alguns animais do grupo A (controle negativo).

A especificidade do teste foi confirmada através das 30 diferentes cepas de vírus e bactérias causadoras de doenças em frangos, as quais não apresentaram produto de amplificação.

O sequenciamento dos produtos de amplificação dos dois grupos de animais inoculados experimentalmente indicou que os dois grupos de animais foram infectados com uma cepa de CAV geneticamente idêntica à vacinal, utilizada na inoculação do grupo B.

A sensibilidade da "nested-PCR", determinada a partir de diluições seriadas da vacina para CAV, foi de 0,16 DICC<sub>50%</sub>. Não foram gerados produtos de amplificação a partir do DNA extraído de 15 soros de lotes de reprodutoras avós controlados para CAV e das 30 amostras de vírus e bactérias utilizadas para avaliar a especificidade da reação.

O DNA do CAV foi detectado na maioria das amostras testadas no presente trabalho. As amostras positivas eram de aves pertencentes a 40 dos 47 diferentes lotes testados (Tabela 1). Todas as empresas investigadas tiveram pelo menos um lote positivo para o CAV.

#### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Estudos anteriores utilizando testes de ELISA para a detecção de anticorpos em matrizes evidenciaram uma elevada prevalência de CAV nas empresas avícolas do Brasil (Brentano et al. 2000, Canal et al. 2004). No presente trabalho, buscamos confirmar a presença do CAV através da detecção do DNA deste agente, inicialmente em pintos infectados experimentalmente e, subseqüentemente, em amostras de galinhas de criações comerciais e em amostras de cama utilizadas nestas criações. A primeira etapa consistiu em verificar qual protocolo de purificação de DNA seria o mais adequado para a extração de DNA viral a partir de diversos tipos de amostras de tecidos de aves. Constatou-se que o DNA purificado por tiocianato de guanidina adaptado de Rademaker & Bruijn (1997) gerou uma maior quantidade de

produto de amplificação na "nested-PCR" sem o aparecimento de bandas espúrias, razões pelas quais o mesmo foi adotado para a continuação deste estudo. Além disso, este protocolo mostrou-se mais rápido e econômico do que os demais testados. Estas características são importantes na implementação de uma técnica adaptável à rotina diagnóstica do laboratório.

O protocolo utilizado permitiu a extração de DNA viral adequado para as reações de amplificação, a partir de tecidos, soro e amostras de cama aviária. Este foi o primeiro trabalho que descreveu a detecção do DNA do CAV a partir de cama aviária. O CAV é resistente no meio ambiente (Schat 2003), além de ser excretado nas fezes em grandes quantidades (Hoop 1992). Desta maneira, a utilização de cama aviária para a detecção do vírus possui algumas vantagens, já que não requer o sacrifício e nem necropsias de animais, além de permitir a amostragem de vários animais de um mesmo lote. A detecção do DNA do CAV a partir de cultivos celulares, como proposto previamente (Todd et al. 1992, Imai et al. 1998), é pouco prática na rotina diagnóstica, uma vez que são necessários dias para a multiplicação do vírus, o que torna o diagnóstico mais demorado e oneroso. Além disso, algumas amostras não replicam em cultivos celulares (Islam et al. 2002), podendo gerar resultados falsos negativos.

Considerando que as amostras de CAV circulantes no Brasil poderiam apresentar diferenças genéticas em relação às que apresentam seqüências disponíveis no GenBank, buscou-se estabelecer uma reação que diminuísse os riscos de obtenção de resultados falsos negativos e ao mesmo tempo proporcionando uma alta especificidade e sensibilidade. Nesse sentido, selecionaram-se *primers* de seqüências conservadas do gene que codifica a VP1. Associando uma extração de DNA eficiente e condições ideais de amplificação, foi possível desenvolver uma "nested-PCR" com

sensibilidade equivalente à detecção de 0,16 DICC<sub>50</sub> em cultivos celulares. Outros protocolos descritos foram capazes de detectar aproximadamente 100 cópias do genoma (Tham e Stanislawek 1992), ou 100 a 200 moléculas de DNA (Cardona et al. 2000), ou 10<sup>0,5</sup> DICC<sub>50</sub> (Imai et al. 1998). Davidson et al. (2004) utilizando um protocolo descrito por Imai et al. (1998), não foram capazes de detectar o DNA viral em lotes sem sinais clínicos, provavelmente, devido à sensibilidade do teste. A "nested-PCR" aqui descrita foi aproximadamente 20 vezes mais sensível do que esta última (Imai et al. 1998), sendo capaz de amplificar o DNA do CAV mesmo em lotes com infecção subclínica. Este tipo de infecção causa imunodepressão (Adair 2000, Schat 2003), potencializa infecções causadas por patógenos oportunistas (Could et al.1992a,b, Miles et al. 2001, Davidson et al. 2004) e provoca diminuição da eficiência de vacinas (Schat 2003). Desta forma, o diagnóstico de formas subclínicas da infecção em lotes com baixo desempenho é importante para identificar as causas de perdas econômicas, já que os sinais observados podem ser causados por outros agentes oportunistas.

Os resultados obtidos com os soros de frangos de corte sem anticorpos para o CAV (Rubin et al. 2003) e positivos na "nested-PCR" sugerem que frangos sem anticorpos para o CAV, mas com infecção recente, estão presentes no momento do abate. Isso revela que o diagnóstico baseado na detecção de anticorpos pode ser pouco informativo no monitoramento das infecções causadas por este vírus.

A alta sensibilidade da "nested-PCR" também é uma característica importante nas investigações que visam determinar a transmissão vertical do vírus ou a provável latência do mesmo (Todd et al. 1992, Miller et al. 2003). Ao realizar a "nested-PCR" com soro de matrizes com anticorpos para CAV, constatou-se que o DNA do agente pode persistir mesmo depois de ocorrida a soroconversão, como igualmente

observado por outros autores (Cardona et al. 2000). Nesse sentido, os resultados aqui obtidos subsidiam os achados de Miller et al. (2003), Sommer & Cardona (2003) e Brentano et al. (2005) que demonstraram que matrizes com anticorpos podem transmitir o vírus para a progênie. A transmissão vertical é a mais preocupante, já que os sinais clínicos são mais acentuados quando a infecção acontece nos primeiros dias de vida (Schat 2003). A detecção do DNA de CAV a partir de soro poderá ser usada como ferramenta para futuros estudos sobre transmissão vertical e persistência do vírus após a soroconversão.

A contaminação dos animais controle utilizados na infecção experimental, provavelmente, ocorreu devido à contaminação cruzada durante o experimento. Os resultados do seqüenciamento reforçam essa hipótese, visto que os animais deste grupo apresentaram um produto de amplificação com seqüência idêntica a da amostra vacinal. Estes achados reforçam a alta capacidade de disseminação deste vírus e a necessidade da utilização de medidas de biossegurança rigorosas para evitar a disseminação deste vírus entre os plantéis (Schat 2003).

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que a "nested-PCR" estabelecida para o CAV foi específica e sensível, possibilitando a detecção do agente em infecções clínicas e subclínicas, em aves com e sem anticorpos e na cama empregada em sua criação. Constatou-se que o vírus está presente na maioria das empresas avícolas da Região Sul do Brasil investigadas.

#### Agradecimentos

Agradecemos as empresas avícolas pelo fornecimento das amostras biológicas. S. Simionatto e L.L. Rubin receberam bolsa de estudos da Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), a Pró-reitoria de Pesquisa da UFRGS e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo suporte financeiro.

#### REFERÊNCIAS

Adair B.M. 2000. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. Develop. Comp. Immunol. 24:247-255.

Beltrão N., Furian T.Q., Leão J.A., Pereira R.A., Moraes L.B. & Canal C.W. 2004. Detecção do vírus da laringotraqueite das galinhas no Brasil. Pes. Vet. Bras. 24(2):85-88.

Brentano L., Silva B.G., Sayd S. & Flores S.W. 2000. Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte do Brasil. Revta Bras. Ciênc. Avic 2(2):157-179.

Brentano L., Lazzarin S., Bassi S.S., Klein T.A.P., Schat K.A. 2005. Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. Vet. Microbiol. 105: 65-72.

Canal C.W., Rocha S.L.S., Leão J.A., Fallavena L.C.B., Oliveira S.D. & Beltrão N. 2003. Detecção de *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Cienc. Rural 33:377-379.

Canal C.W., Ferreira D.J., Macagnan M., Fallavena L.C.B, Moraes H.L.S. & Wald V.A.B. 2004. Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in Southern Brazil. Pes. Vet. Bras. 24(2):89-92.

Cardona C.J., Oswald W.B. & Schat K.A. 2000. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. J. Gen. Virol. 81:2067-2075.

Chettle N.J., Eddy R.K., Wyeth P.J. & Lister S.A. 1989. An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in England. Vet. Rec. 124:211-215.

Davidson I., Kedem M., Borochovitz H., Kass N., Ayali G., Hamzani E., Perelman B., Smith B. & Perk S. 2004. Chicken anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. Avian Dis. 48:108-118.

Hirt B. 1967. Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. J. Mol. Biol. 26:365-369.

Hoop R.K. 1992. Persistence and vertical transmission of chicken anemia agent in experimentally infected laying hens. Avian Pathol. 21:493-501.

Imai K., Mase M., Yamaguchi S. & Yuasa N. 1998. Detection of chicken anaemia virus from formalin-fixed tissues by polimerase chain reaction. Res. Vet. Sci. 64:205–208.

Islam M.R., Johne R., Raue R., Todd D. & Müller H. 2002. Sequence analysis of the full-lenght cloned DNA of chicken anemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence for genetic grouping of CAV strain based on the deduced amino acid sequence. J. Vet. Med. B 49:332-337.

McCarthy C. 1996-1998. Chromas. Versão 1.45 (32-bit). School of Health Science, Griffith Universaty, Austrália. <a href="http://technelysium.com.au/chromas.html">http://technelysium.com.au/chromas.html</a>

McNulty M.S., Mcilroy S.G., Bruce D.W. & Todd D. 1991. Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. Avian Dis. 35:263-268.

Miles A.M., Reddy S.M. & Morgan R.W. 2001. Coinfection of specific-pathogen-free chickens with Marek's disease virus (MDV) and chicken infectious anemia virus: effect of MDV pathotype. Avian Dis. 45:9–18.

Miller M.M., Ealey K.A., Oswald W.B. & Schat K.A. 2003. Detection of chiken anemia virus DNA in embrional tissues and eggshell membranes. Avian Dis. 47:662-671.

Murphy F.A. 1996. Virus taxonomy, p.15-58. In: Fields B.N., Knipe D.M. & Howley, P.M. Fields Virology. 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.

Noteborn M.H.M., De Boer G.F., Van Roozelaar D.J., Karreman C., Kranenburg O., Vos J.G., Jeurissen S.H.M., Hoeben R.C., Zantema A., Koch G., Van Ormondt G.H. & Van Der Eb A.J. 1991. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle. J. Virol. 65(6):3131-3139.

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

Rademaker J.L.W. & De Bruijn F.J. 1997. Characterization and classification of microbes by REP-PCR genomic fingerprinting and computer-assisted pattern analysis, p.151-171. In: DNA markers: protocols, applications, and overviews. Caetano-Anollés G. & Gresshoff P.M. (ed.) J. Wiley and Sons, New York.

Renshaw R.W., Soiné C., Weinkle T., O'Connel P.H., Ohashi K., Watson S., Lucio B., Harrington S. & Schat K.A. 1996. A hipervariable region in vp1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. J. Virol. 70:8872-8878.

Rubin L.L., Ávila A.L., Ribeiro, A.M.L., Wald V.B. & Canal C.W. 2003. Comparação do desempenho entre frangos de corte positivos e negativos para anticorpos contra o vírus da anemia das galinhas. Braz. J. Microbiol. 34:88-89.

Sambrook J. & Russel D.W. 2001. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3<sup>rd</sup> ed.Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Schat K.A. 2003. Infectious anemia, p.182-202. In: Saif Y.M., Barnes H.J, Fadly A.M., Clisson J.R., McDougald L.R. & Swayne D.E. (ed.) Diseases of Poultry. 11<sup>th</sup> ed. Iowa State University, Ames. p.1189.

Sommer F. & Cardona C. 2003. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. Avian Dis. 47:1466-1473.

Tham K.M. & Stanislawek W.L. 1992. Polimerase chain reaction amplification for direct detection of chicken anemia virus DNA in tissues and sera. Avian Dis. 36:1000-1006.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F. & Higgins D.G. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 24:4876-4882.

Todd D., Mawhinney K.A. & McNulty M.S. 1992. Detection and differentiation of chicken anemia virus isolates by using the polimerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 30:1661-1666.

Yilmaz H., Turan N., Ozgur N.Y., Helps C.R. & Akay O. 2001 Detection of chicken anemia virus DNA in the thymus of naturally infected chicks in Turkey. Avian Dis. 45:529-533.

Yuasa N., Noguchi K., Furata K. & Yoshida I. 1980. Maternal antibody and its effect on the susceptibility of chicks to chicken anemia agent. Avian Dis. 24:197-201.

Yuasa N., Taniguchi T. & Yoshida I. 1979. Isolation and some characteristics of an agent inducing anemia in chicks. Avian Dis. 23:366-385.

# Legenda figura 1

Figura 1: Eletroforese dos produtos da "nested-PCR" em gel de agarose (1,2 %) corado com brometo de etídio. Coluna 1, marcador de tamanho molecular de 100 pb; coluna 2, controle positivo da "nested-PCR"; colunas 3 a 7, amostras positivas; colunas 8, 9 e 10, controles negativos da extração de DNA, PCR e "nested-PCR", respectivamente.

Tabela 1: Resultados das reações de "nested-PCR" obtidos com as amostras procedentes de diferentes lotes sem (SD) ou com doença clinicamente aparente (CD).

Tipo de amostra	Número de amostras	Número de lotes	Amostras positivas
Cama aviária	15	15	15
Soro de frangos de corte	20	3	20
Soro de matrizes com anticorpos	20	4	7
Soro de avós negativas para CAV	15	2	0
Órgãos de frangos de corte SD	30	15	26
Órgãos de frangos de corte CD	10	8	10
Total	110	47	78

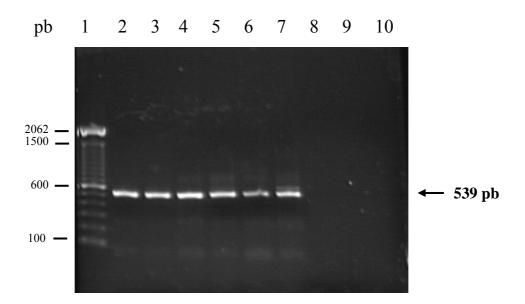


Figura 1

# 2.2 Caracterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anemia virus

Trabalho em elaboração que será submetido à Revista Virus Genes.

- 1. Title: Characterization and phylogenetic analysis of Brazilian chicken anemia virus
- 2. Authors: Simone Simionatto<sup>1</sup>, Carlos André da Veiga Lima-Rosa<sup>2</sup>, Eliseu Binneck<sup>3</sup>, Ana Paula Ravazzolo<sup>1</sup>, Cláudio Wageck Canal<sup>1</sup>
- <sup>1</sup> Laboratório de Virologia, Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Av. Bento Gonçalves 9090, Cep: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: claudio.canal@ufrgs.com.br
- <sup>2</sup> Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.
- <sup>3</sup> Laboratório de Biotecnologia e Bioinformática, Embrapa Soja, Londrina, PR, Brasil.
- 3. Running title: CAV phylogenetic analysis
- 4. Key words: chicken anemia virus (CAV), genotyping, nested-PCR, phylogeny, genetics and virology
- 5. To whom proofs should be sent: Cláudio Wageck Canal

#### **Abstract**

Chicken anemia virus (CAV) was detected by a Nested-PCR assay in field samples from different regions of Brazil. The 539 bp amplified fragments from the *vp1* gene of 44 field samples were sequenced. Ten new nucleotide sequences of CAV were selected and analysed phylogenetically by Mega2 using neighbour joining distance methods with 1000 bootstrap replications. Phylogenetic analysis did not show correlations between CAV pathology pattern and genetic groups. The nucleotide sequences for the 10 Brazilian samples were also analysed together with sequences from 30 previously described CAV strains. It was observed genetic variability worldwide and did not form geographical grouping. Amino acid substitutions were detected at 9 positions of the Brazilian sequences and two of them were not observed before, <sup>65</sup>R replacing the Q residue and <sup>98</sup>F replacing Y residue.

#### Introduction

Chicken anemia virus (CAV) was first described in 1979 by Yuasa in Japan [1]. Since then, CAV has been detected worldwide by isolation, serology or DNA amplification in both laying and broiler chickens. The presence of CAV by polymerase chain reaction (PCR) has been investigated in cell culture, sera and tissues [2, 3, 4, 5, 6]. CAV is a member of the family *Circoviridae*, genus *Gyrovirus* [7]. The CAV genome structure is composed by a ssDNA circular molecule of about 2.3 kb with three open reading frames (ORFs) coding for proteins of 52 (VP1), 24 (VP2) and 14 (VP3) kDa [8]. CAV infections manifest either clinical or subclinical signs [9] and both result in measurable economical losses [10, 11, 12]. Signs include stunting, increased mortality, anemia, bone marrow cell depletion, subcutaneous hemorrhage, and atrophy of secondary lymphatic organs [13]. This infection is often associated with secondary bacterial, viral infections or vaccination failures [14, 15, 16, 17]. CAV can be vertically transmitted by either dam or sire to progeny [18, 9]. The transmission of virus is greatly reduced but not entirely eliminated in immune birds [5].

CAV was known as a very conserved virus of one serotype [1] with several genetic groups [19], although an additional serotype has been recently reported [20, 21]. Renshaw et al. [22] identified a hipervariable region in VP1 and suggested that certain amino acid exchanges in this region could influence the rate of virus replication and spread of CAV strains in MDCC-MSB-1 cells. Moreover, van Santen et al. [23] indicated the presence of more than one virus isolate from clinical specimens obtained from poultry farms in USA that differ considerably in their sequences. Recently, Chowdhury et al. [24] also reported that the low and high passage isolates had phylogenetic divergence and differ in their pathogenicities, but

it would not accurately predict the phylogeny of the virus and rather it is more indicative of selection of a particular isolate in the cell culture.

Little is know about the phylogenetic analysis of the CAV Brazilian samples. In the present work, we report the amplification of CAV DNA based on a *vp1* fragment from Brazilian field samples. The amplification products were sequenced and submitted to phylogenetic analysis by neighbor joining distance methods to evaluate genetic diversity and a possible correlation with their pathology behaviour.

#### **Material and Methods**

Field Samples

One hundred and fifty field samples from commercial breeders, broilers and Caipira chickens (originated by random crosses among different breeds introduced in Brazil following colonization, around 1500) [25] were analysed. They were selected from different Brazilian geographic regions and collected through the year 2000 until 2004. Tissue samples (80), sera (55) and litter (15) were collected from flocks and establishments suspected of chicken anemia or without suspicious. Also, samples from flocks suspected of being infected with infectious bursal disease virus (IBV), *Pasteurella multocida* (PM), infectious laryngotracheitis virus (ILTV), and Ornithobacterium rhinotracheale (ORT) were used (Table 1).

### DNA Amplification and Sequencing

The DNA extraction methods, primers and cycling conditions for the Nested-PCR assay were performed as described previously [26]. The 539 bp internal amplification products were purified with GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band

Purification Kit (Amersham Biosciences, Sweden). Both strands were sequenced using the Big Dye Terminator version 3.1 cycles sequencing RR-100 kit on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

### Sequence Analysis

The obtained nucleotide sequences and the deduced amino acid sequences were aligned using ClustalW (27). GeneDoc software [28] was used to measure similarity degrees. Kimura 2-parameter pairwise distances [29], calculated for the different nucleotide sequences detected in Brazil were used to construct a phylogenetic unrooted tree by using the neighbour joining distance methods in the Molecular Evolutionary Genetics Analysis software MEGA2 [30]. The statistical confidence of the tree topologies was performed by 1000 bootstrap replications on the same software.

In order to compare Brazilian sequences, we detected seventy five homologous sequences in GenBank, comprising the same genome region obtained in this work. Then, a total of thirty GenBank sequences were selected by representing the diversity of CAV worldwide to compare with the Brazilian samples in the phylogenetic studies (using the same analysis method as described above).

#### **Results**

From the 150 field samples analised, 135 were Nested-PCR positive. After analysis, to represent flocks from different geographical regions, 44 samples were selected for nucleotide sequencing. Twenty three (52%) of them displayed more than one sequence in the same sample. All CAV DNA sequences from samples from São Paulo (8) and Minas Gerais (2) States displayed more than one sequence in the same

amplification reaction. The remaining unambiguous 21 sequences (48%) were aligned and 10 representative sequences with 92.0-99.0% similarity were found. Five sequences detected in clinically healthy flocks were identical and are represented here by AY855079 sample, which showed 100% identity to the amplification product of a commercial vaccine (Nobilis CAV P4, Intervet International, Netherlands) sequenced by us.

Phylogenetic analyses of Brazilian samples were performed to verify the possible relationship of pathology CAV samples with a specific genetic group. Phylogenetic tree showed three groups (Fig. 1). The first (I) was formed by four sequences (AY855079, AY855084, AY855085 and AY855086) detected in clinically healthy flocks and litter. The second group (II) was formed by two sequences (AY855080 and AY855081) detected in flocks with ORT suspicious. The third group (III) was composed by four samples (AY855082, AY855083, AY855087 and AY855088). The sequence AY855082 shared significant similarity (99%) to AY855088, both were detected in poultry with CAV clinical sings. Seven other sequences were identical to AY855082 and were detected in flocks with clinical sings attributed to CAV, PM, ILTV and ORT. AY855003 were detected in clinically healthy flocks and the AY855087 in flocks suspected of IBV infection. These ten Brazilian sequences did not show any geographical relationship between genetic group and Brazil States.

Brazilian nucleotide sequences were compared with the 30 other CAV strains deposited in the database to know if there was any geographical relationship worldwide. The phylogenetic tree not showed geographical correlation, but the some Brazilian samples demonstred more homologies with USA samples (Fig. 2).

Phylogenetic trees constructed by using maximum parsimony or maximum likelihood methods also supported the same grouping as well as the bootstrap values.

The deduced VP1 amino acid sequences of the 10 Brazilian samples, aligned with 30 other CAV described obove, showed amino acid substitutions in 9 different positions. Two of then sequences presented novel amino acid substitution, <sup>65</sup>R replacing the Q residue in AY855088 and <sup>98</sup>F replacing the Y residue in AY855085, encoded by most previously characterized CAV genomes (Fig. 3). AY855088 sequence was detected in a Caipira chicken with severe symptons of anemia and AY855085 was detected in commercial breeders with IBV infection suspecious.

#### **Discussion**

The sequence of a 539 nucleotide portion of the 2.3 kb CAV genome from commercial and Caipira broiler chickens and hens from Brazil were obtained. The DNA samples were extracted from biological specimens, without virus isolation in cell culture. This procedure enable us to characterize CAV that might not have replicated *in vitro* and avoided the potential nucleotide changes that can occure during cell culture passage. Besides, some isolates do not replicated in common cell culture [19]. The analysis of the nucleotide sequences obtained by the *vp1* amplification of field samples showed that 52% of the samples had more then one sequence. Probably, these chickens were infected by more than one strain. This finding is in agreement with the observations of van Saten et al. [23] who reported ambiguous sequences in PCR products. Claessens et al. [32] also reported nucleotide differences in two clones obtained from the same sample.

Phylogenetic analysis of the 10 nucleotide sequences described in the present work displayed three groups. Also, it was not observed relationship of pathology

CAV samples with genetic group. This could be because the severity of CAV disease also depends on the presence of other infectious pathogens. Interestingly, the AY855079 sequence, detected in clinically health flocks, was highly divergent to AY855088, detected in chicken with clinical signs. These results were similar to an earlier study that indicated the isolates had phylogenetic divergence and different pathogenicities [24].

The phylogenetic tree of Brazilian samples and the 30 CAV discribed did not show geographical correlation. Islam et al. [19] also reported that the Australian strain did not demonstrade any grouping with strains detected in 5 different countries. Brazilian sequences are not all found on a separate group. Thefore, these sequences are not more similar to each other than they are to CAV isolates in other countries. This result was similar with the observations of van Santen et al. with strains from USA [23]. Some Brazilian nucleotide sequences had more homologous to USA strains. It could be explained by the fact that the commercial Brazilian hens and roosters were imported from USA. Our results suggest that diversity showed were probably related with diversity of isolates than virus evolution in Brazil.

Brazilian samples differed in 42 nucleotide positions that resulted in 9 predicted amino acid substitutions. The VP1 alignment revealed a hipervariable region from amino acid positions 139 to 157, confirming findings from an earlier study by Renshaw et al. [22]. However, other variable region from amino acid positions 75 to 98 was observed. Scott et al. [33] suggested that an amino acid substitution ( $T \rightarrow A$ ) at position 89 in the VP1 could be associated with the non-reactivity of one monoclonal antibody as well as the attenuation of some strains. We observed that the 10 Brazilian samples had  $^{89}T$ . Interestingly, only two of these samples were present in broilers with clinical signs of chicken anemia, indicating that

probably other factors are involved in the clinical disease. This discrepancy could be atributed to the use of clones sequenced from high passage viruses [33].

Seven out of the 10 Brazilian samples had <sup>75</sup>I, <sup>97</sup>L, <sup>139</sup>Q and <sup>144</sup>Q amino acid profile and three had <sup>75</sup>V, <sup>97</sup>M, <sup>139</sup>K and <sup>144</sup>E amino acid profile. These findings are in agreement with an earlier study of 14 CAV strains detected in 10 clinical samples obtained from commercial broiler chickens in Alabama State, USA, characterized by direct sequencing of the 5'half of the VP1 gene [23]. In addition, the amino acids at positions 139 and 144 did not appear to be independent of each other, as was described by the same author. A <sup>139</sup>Q is always accompanied by a <sup>144</sup>Q and <sup>144</sup>E is always accopanied by a <sup>139</sup>K.

Renshaw et al. [22] suggested that  $^{139}$ Q and/or  $^{144}$ Q can influence the rate of replication or spread of infection in MDCC-MSB-1 cells. Seven out of the 10 samples obtained from broiler chickens in Brazil had  $^{139}$ Q and  $^{144}$ Q. Two of them, were detected in flocks with CAV clinical signs. It was observed that three samples which had  $^{75}$ V,  $^{97}$ M,  $^{139}$ K and  $^{144}$ E amino acid positions, were detected in flocks without CAV clinical signs and these residues could be associated with attenuated viruses. The AY855088 sequence, detected in chicken with severe anemia signs, presented amino acid change in position 65 (Q  $\rightarrow$  R) not observed before, which could be involved in the pathogenicity of CAV strains. These questions will require more investigations to confirm correlations between pathogenicity and genetic determinats. The knowledge about these differences and their pathogenic potencial may be useful in the development of vaccines. However, sequence analysis and biological studies require careful interpretation concerning the mutation in the CAV genome and also pressure selection of cell culture.

In conclusion, phylogenetic analysis of the Brazilian samples did not show relationship between pathology differences and the genetic groups. Genetic variability was observed worldwide and did not form geografical grouping as showed is this work. The results obtained add new and important informations about genetic variability of VP1 in Brazil and its putative correlations with CAV pathogenesis.

### Acknowledgements

We thank Brazilian chicken rearing companies for help in the collection of biological material. S. Simionatto received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Financial support was provided by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (PROPESQ/UFRGS).

### References

- 1. Yuasa N., Taniguchi T., and Yoshida I., Avian Dis 23, 366-385, 1979.
- 2. Todd D., Mawhinney K.A., and McNulty M.S., J Clinical Microbiol 30,1661-1666, 1992.
- 3. Tham K.M., and Stanislawek W.L. Avian Dis 36,1000-1006, 1992.
- 4. Imai K., Mase M., Yamaguchi S., and Yuasa N., Res Vet Sci 64, 205–208, 1998.
- 5. Cardona C.J., Oswald W.B., and Schat K.A., J Gen Virol 81, 2067-2075, 2000.
- Yilmaz H., Turan N., Ozgur N.Y., Helps C.R., and Akay O., Avian Dis 45, 529-533, 2001

- 7. Pringle C.R., Arch Virol 144, 2065-2070, 1999.
- 8. Noteborn M.H.M., De Boer G.F., Van Roozelaar D.J., Karreman C., Kranenburg O., Vos J.G., Jeurissen S.H.M., Hoeben R.C., Zantema A., Koch G., van Ormondt G.H., van Der Eb A.J., J Virol 65, 3131-3139, 1991.
- 9. Schat K.A. (eds.). Infectious anemia. Saif Y.M., Barnes H.J, Fadly A.M., Clisson J.R., Mcdougald L.R., and Swayne D.E., Iowa State University, 2003, pp.182-202.
- 10. McNulty M.S., Mcilroy S.G., Bruce D.W., and Todd D., Avian Dis 35: 263-268, 1991.
- 11. McLlroy S.G., McNulty M.S., Bruce D.W., Smyth J.A., Goodall E.A., and Alcorn M.J., Avian Dis 36, 566-574, 1992.
- 12. Davidson I., Kedem M., Borochovitz H., Kass N., Ayali G., Hamzani E., Perelman B., Smith B., and Perk S., Avian Dis 48, 108-118, 2004.
- 13. Adair B.M., Dev Comp Immunol 24, 247-255, 2000.
- 14. Cloud S.S., Rosenberger J.K., and Lillehoj H.S. Vet Immunol Immunop 34, 353-366, 1992.
- 15. Cloud S.S., Lillehoj H.S., and Rosenberger J.K., Vet Immunol Immunop 34, 337-352, 1992.
- 16. Miles A.M., Reddy S.M., and Morgan R.W., Avian Dis 45, 9–18, 2001.
- 17. Toro H., González O., Escobar C., Cerda L., Morales M.A., and Gonzeles C., Avian Dis 45, 215–222, 2001.

- 18. Hoop R.K., Avian Pathol 21, 493-501, 1992.
- 19. Islam M.R., Johne R., Raue R., Todd D., and Müller H., J Vet Med B 49, 332-337, 2002.
- 20. Spackman E., Cloud, S.S., Pope C.R., and Rosenberger J.K., Avian Dis 46, 945-955, 2002.
- 21. Spackman E., Cloud, S.S., and Rosenberger J.K., Avian Dis 46, 956-963, 2002.
- 22. Renshaw R.W., Soiné C., Weinkle T., O'Connel P.H., Ohashi K., Watson S., Lucio B., Harrington S., and Schat K.A., J Virol 70, 8872-8878, 1996.
- 23. van Saten V.L., Li, L., Hoerr F.J., and Lauerman L.H., Avian Dis 45, 373-388, 2001.
- 24. Chowdhury S.M.Z.H., Omar A.R., Aini I., Hair-Bejo M., Jamaluddin A.A., Md-Zain B.M., and Kono Y., Arch Virol 148, 2437-2448, 2003.
- 25. Lima-Rosa C.A.V., Canal C.W., Streck A.F., Freitas L.B., Delgado-Cañedo A., Bonatto S.L., and Salzano F.M., Anim Genet 35, 278-284 2004.
- 26. Simionatto S., Lima-Rosa C.A.V., Rubin L.L., and Canal C.W., Pes Vet Bras in press, 2005.
- Thompson, J. D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J., Nucleic Acids Res 22,4673-4680, 1994.
- 28. Nicholas K.B. Nicholas H.B.Jr, Deerfield D.W.I.I., Embnew News 4, 14, 1997.
- 29. Kimura M., J Mol Evol 16, 111-120, 1980.

- 30. Kumar S., Tamura K., and Nei M., MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis. Pennsylvania State University, University Park, PA. 1993.
- 32. Claessens J.A.J., Schrier C.C., Mockett A.P.A., Jagt E.H.J.M., and Sondermeijer P.J.A., J Gen Virol 72, 2003-2006, 1991.
- 33. Scott A.N.J., Connor T.J., Creeland J.L., and McNulty, M.S., Arch Virol, 144, 1961-1975, 1999.

Table 1. Brazilian samples related to clinical and serological status.

GenBank accession No.	No. of sequences <sup>a</sup>	Clinical/sorological status <sup>b</sup>	Sample's geografical regions <sup>c</sup>
AY855079	5	Clinically healthy	RS, SC, PR
AY855080	1	ORT antibody	RS, SC
AY855081	1	ORT antibody	RS, SC
AY855082	8	CAV, ILTV, PM and ORT clinical signs	RS, SC, PR
AY855083	1	Clinically healthy	RS
AY855084	1	Litter from clinically healthy flocks	RS
AY855085	1	IBV suspected	GO
AY855086	1	IBV suspected	PR
AY855087	1	IBV suspected	PR
AY855088	1	CAV clinical sings	RS
Total	21	-	-

- a Except AY855079 and AY855082 sequences occurred in one sample only. In these cases, two independent amplification and sequencing were performed to assure the reability of the results.
- b ORT (Ornithobacterium rhinotracheale); PM (Pasteurella multocida); ILTV (infectious laryngotracheitis virus); IBV (infectious bursal disease virus).
- c Brazilian States: RS (Rio Grande do Sul); SC (Santa Catarina); PR (Paraná); GO (Goiás);

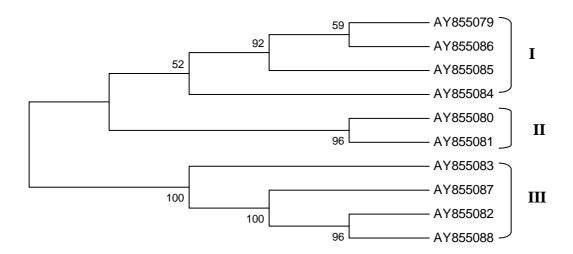


Fig. 1. Phylogenetic analysis among 10 Brazilian strains based on a fragment from the *vp1* nucleotide sequences of CAV using neighbor-joining distance method (1000 bootstrap replications). I, II and III: grupos genéticos.

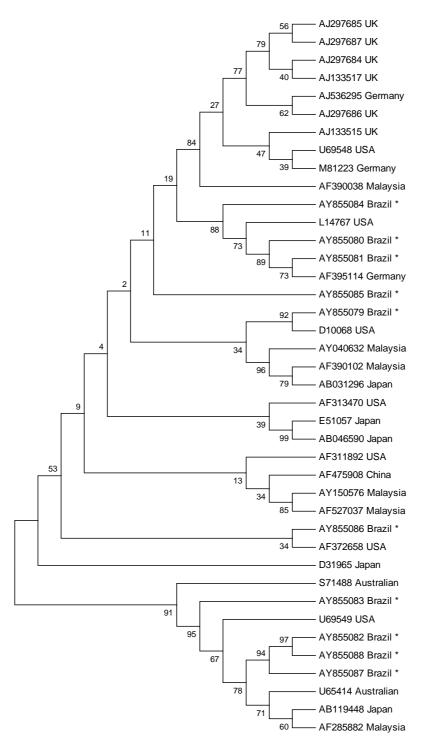


Fig. 2. Phylogenetic tree showing relationship among 10 Brazilian and 30 VP1 nucleotide sequences from different countries using neighbor joining distance method, with 1000 bootstrap replications. Asterisks display Brazilian strains.

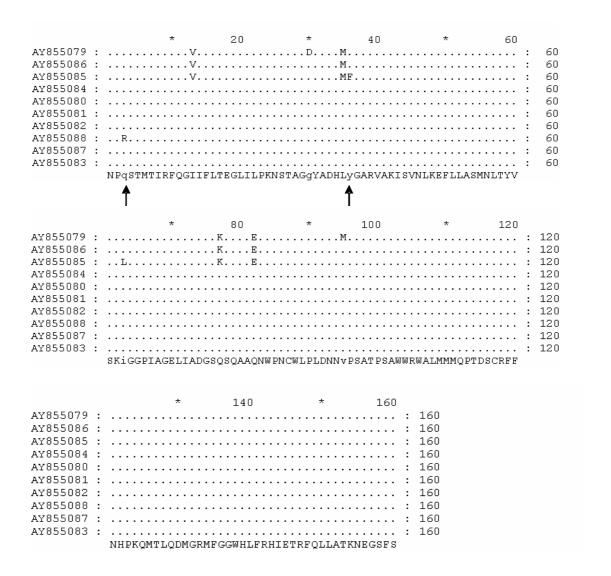


Fig. 3: Alignment of the deduced amino acid sequences of VP1 from Brazilian samples and strat in amino acid 63. The consensus amino acid sequence is shown below the aligned sequences. Arrows indicate the new amino acid changes (only observed in these samples).

## **3 CONCLUSÕES FINAIS**

- 1. A associação de um método de purificação de DNA eficiente com um protocolo de PCR adequado possibilitou estabelecimento de uma *Nested-*PCR com alta sensibilidade, o que permitiu a detecção do DNA do CAV em diferentes amostras biológicas, bem como de infecções clínicas e subclínicas.
- 2. Constatou-se que o CAV está presente na maioria dos lotes testados neste experimento e que o DNA deste agente pode persistir nas aves mesmo depois da soro conversão.
- 3. A maior parte dos produtos de amplificação da *Nested-*PCR apresentou mais de uma sequência de DNA, sugerindo que diferentes cepas podem coexistir na mesma ave.
- 4. Foram detectadas 10 novas sequências nucleotídicas do CAV no Brasil, sendo que duas delas apresentam uma substituição de animo ácido até então não descrita na literatura.
- 5. A árvore filogenética das 10 sequências nucleotídicas detectadas no Brasil demonstrou que não houve relação entre a patologia apresentada pelas amostras de CAV e os grupos genéticos. Porém, as sequências nucleotídicas obtidas de amostras de frango com sintomatologia clínica apresentaram maior homologia entre si do que com as obtidas de frangos sem sintomatologia clínica, demonstrando uma sutil relação entre a patogenia das amostras e a composição genética das mesmas.
- 6. A análise filogenética das amostras brasileiras do CAV juntamente com 30 seqüências de outros países demonstrou que não há relação geográfica entre elas, apesar da maioria ter apresentado homologia com as isoladas nos Estados Unidos.

# 4 REFERÊNCIAS

ADAIR, B. M. Immunopathogenesis of chicken anemia virus infection. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 24, p. 247-255, 2000.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS PRODUTORES E EXPORTADORES DE FRANGOS – ABEF. **Produção mundial de carnes de frangos.** Disponível em: <a href="http://www.abef.com.br">http://www.abef.com.br</a> Acesso em: 29 nov. 2004.

ASSOCIAÇÃO GAÚCHA DE AVICULTURA – ASGAV. **Exportação Mundial de carne de frango em 2005**. Disponível em: <a href="http://www.asgav.com.br">http://www.asgav.com.br</a> Acesso em: 29 nov. 2004.

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

BIEGAI, M. 2004. Frango: preço e produção recordes. **Ave World,** n. 13, p. 50-52.

BRENTANO, L.; MORES, N.; WENTZ, I.; CHANDRATILLEKE, D.E.; SCHAT, K. A. Isolation and identification of chicken infectious anemia virus in Brazil. **Avian Diseases**, v. 35. p. 793-800, 1991.

BRENTANO, L. Anemia infecciosa das galinhas. In: BERCHIERI, Angelo Jr.; MACARI, Marcos. **Doenças das Aves**. 1. ed. São Paulo: OESP Gráfica, 2000. cap. 5, p. 339-350.

BRENTANO L.; SILVA, B.G.; SAYD, S.; FLORES, S.W. Anticorpos para o vírus da anemia das aves (CAV) em matrizes de corte do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 2, n. 2, p. 157-179, 2000.

BRENTANO L.; LAZZARIN S.; BASSI S.S.; KLEIN T.A.P.; SCHAT K.A. Detection of chicken anemia virus in the gonads and in the progeny of broiler breeder hens with high neutralizing antibody titers. **Veterinary Microbiology**, v. 105, p. 65-72, 2005.

CANAL, C.W.; FERREIRA, D.J.; MACAGNAN, M.; FALLAVENA, L.C.B; MORAES H.L.S.; WALD, V.A.B. Prevalence of antibodies against chicken anemia virus in broiler breeders in Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 2, p. 89-92, 2004.

CARDONA, C.J.; OSWALD, W.B.; SCHAT, K.A. Distribution of chicken anaemia virus in the reproductive tissues of specific-pathogen-free chickens. **Journal of General Virology**, v. 81, p. 2067-2075, 2000.

CHETTLE, N.J.; EDDY, R.K.; WYETH, P.J.; LISTER, S.A. An outbreak of disease due to chicken anaemia agent in broiler chickens in England. **The Veterinary Record**, v.124, p. 211-215, 1989.

CHOWDHURY, S.M.Z.H.; OMAR, A.R.; AINI, I.; HAIR-BEJO, M.; JAMALUDDIN, A.A.; MD-ZAIN, B.M.; KONO Y. Patogenicity, sequence and phylogenetic analysis of Malaysian chicken anemia virus obtained after low and high passages in MSB-1 cell. **Archives of Virology**, v. 148, p. 2437-2448, 2003.

CLOUD, S.S., ROSENBERGER, J.K.; LILLEHOJ, H.S. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. II. Alterations of *in vitro* lymphoproliferation and *in vivo* immune responses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.34, p. 353-366, 1992.

CLOUD, S.S.; LILLEHOJ, H.S., ROSENBERGER, J.K. Immune dysfunction following infection with chicken anemia agent and infectious bursal disease virus. I. Kinetic alterations of avian lymphocyte subpopulations. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 34, p. 337-352, 1992.

DAVIDSON, I.; KEDEM, M.; BOROCHOVITZ, H.; KASS, N.; AYALI, G.; HAMZANI, E.; PERELMAN, B.; SMITH, B.; PERK, S. Chicken anemia virus infection in Israeli commercial flocks: virus amplification, clinical signs, performance, and antibody status. **Avian Diseases**, v. 48, p. 108-118, 2004.

DESOUZART, O. 2004. O futuro da avicultura depois dos anos de magia. **Ave World**, n. 12, p. 26-29.

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

IMAI, K.; MASE, M.; YAMAGUCHI, S.; YUASA, N. Detection of chicken anaemia virus from formalin-fixed tissues by polimerase chain reaction. **Research in Veterinary Science**, v. 64, p. 205–208, 1998.

ISLAM, M.R.; JOHNE, R.; RAUE, R.; TODD, D.; MÜLLER, H. Sequence analysis of the full-lenght cloned DNA of chicken anemia virus (CAV) strain from Bangladesh: evidence for genetic grouping of CAV strain based on the deduced amino acid sequence. **Journal Veterinary Medicine B**, v. 49, p. 332-337, 2002.

LAMICHHANE, M.C.; SNYDER, D.B.; GIRSCHICK, T.; GOODWIN, M.A.; MILLER, S.L. Development and comparison of serologic methods for diagnosing chicken anemia virus infection. **Avian Diseases**, v. 36, p. 725-729, 1992.

McLLROY, S.G.; McNULTY, M.S.; BRUCE, D.W.; SMYTH, E.A.; GOODALL, E.A.; ALCORN, M.J. Economic effects of clinical chicken anemia agent infection on profitable broiler production. **Avian Diseases**, v.36, p. 566-574, 1992.

McKENNA, G.F.; TODD, D.; BORGHMANS, B.J.; WELSH, M.D.; ADAIR, B.M. Immunologic investigations with an attenuated chicken anemia virus in day-old chickens. **Avian Diseases**, v. 47, p. 1339-1345, 2003.

McNULTY, M.S.; CONNOR, T.J.; McNEILLY, F.; McLOUGHLIN, M.F.; KIRKPATRICK, K.S. Preliminary characterization of isolates of chicken anaemia agent from the United Kingdom. **Avian Pathology**, v. 19, p. 67-73, 1990.

McNULTY, M.S. Chicken anemia agent: a review. **Avian Pathology**, v. 20, p. 187-203, 1991.

MCNULTY, M.S.; MCILROY, S.G.; BRUCE, D.W.; TODD, D. Economic effects of subclinical chicken anemia agent infection in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 35, p. 263-268, 1991.

MEEHAN, B.M.; CREELAN, J.L.; MCNULTY, M.S.; TODD, D. Sequence of porcine circovirus DNA: affinities with plant circoviruses. **Journal of General Virology**, v. 78, p. 221-227, 1997.

MEEHAN, B.M.; MCNULTY, M.S.; TODD, D.; KENNEDY, S.; JEWHURST, V.A.; HASSARD, L.E.; CLARK, E.G.; HAINES, D.M.; ALLAN, G.A. Characterization of novel circovirus DNAs associated with wasting syndromes in pigs. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 2171-2179, 1998.

MENDES, A.A.; SALDANHA, E.S.P.B. A cadeia produtiva da carne de aves no Brasil. In: MENDES, A.A.; NÄÁS, I.A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: FACTA, 2004; cap.1, p.1-22.

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**, v. 45, p. 9–18, 2001.

MILLER, M.M.; EALEY, K.A.; OSWALD, W.B.; SCHAT, K.A. Detection of chicken anemia virus DNA in embrional tissues and eggshell membranes. **Avian Diseases**, v. 47, p. 662-671, 2003.

MILLER, M.M.; SHAT, K.A. Chicken infectious anemia virus: An example of the ultimate host-parasite relationship. **Avian Diseases**, v. 48, p. 734-745, 2004.

MIYATA, H.; TSUNODA, H.; KAZI, A.; YAMADA, A.; KHAN, A.; MURAKAMI, J.; KAMAHORA, T.; SHIRAKI, K.; HINO, S. Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, single-stranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. **Journal Virology**, v. 73, p. 3582-3586, 1999.

MURPHY F.A. Virus taxonomy. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996. p. 15-58.

NIAGRO, F.D.; FORSTHOEFEL, A.N.; LAWTHER, R.P.; KAMALANATHAN, L.; RITCHIE, B.W.; LATIMER, K.S.; LUNKERT, P.D. Beak and feather disease virus and porcine circovirus genomes: intermediates between the geminivirus and plant circoviruses. **Archives of Virology**, v. 143, p. 1723-1744, 1998.

NOTEBORN, M.H. M.; DE BOER G.F.; VAN ROOZELAAR, D.J.; KARREMAN, C.; KRANENBURG, O.; VOS, J.G.; JEURISSEN, S.H.M.; HOEBEN, R.C.; ZANTEMA, A.; KOCH, G.; VAN ORMONDT, G.H.; VAN DER EB, A.J. 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.M.; TODD, T.; VERSCHUEREN, C.A.J.; DE GAUW, H.W.F.M.; CURRAN, W.L.; VELDKAMP, S.; DOUGLAS, A.J.; McNULTY, M.S.; VAN DER EB, A.J.; KOCH, G. A single chicken anemia virus protein apoptosis. **Journal of Virology**, v. 68, p. 346-351, 1994a.

NOTEBORN, M.H.M.; VERSCHUEREN, C.A.J.; ZANTEMA, A.; KOCH, G.; VAN DER EB, A.J. Identification of the promoter region of chicken anemia virus (CAV) containing a novel enhacer-like element. **Gene**, v. 150, p. 313-318, 1994b.

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

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

PRINGLE C.R. Virus Taxonomy at the XIth International Congress of Virology, Sydnei, Australia. **Archives of Virology**. v. 144, p. 2065-2070, 1999.

RENSHAW, R.W.; SOINÉ, C.; WEINKLE, T.; O'CONNEL, P.H.; OHASHI, K.; WATSON S.; LUCIO, B.; HARRINGTON, S.; SCHAT, K.A. A hipervariable region in vp1 of chicken infectious anemia virus mediates rate of spread and cell tropism in tissue culture. **Journal of Virology**, v. 70, p. 8872-8878, 1996.

ROY, P.; DHILLON, A.S.; LAURMAN, L.; SHIVAPRASAD, H.L. Detection of pigeon circuvirus by Polymerase Chain Reaction. **Avian Diseases**, v. 47, p. 218-222, 2003.

SCOTT, A.N.J.; CONNOR, T.J.; CREELAND, J.L.; MCNULTY, M.S. Antigenicity and pathogenicity characteristics of molecularly cloned chicken anemia virus isolates obtained after multiple cell culture passages. **Archives of Virology**, v. 144, p. 1961-1975, 1999.

SOMMER, F.; CARDONA, C. Chicken anemia virus in broilers: dynamics of the infection in two commercial broiler flocks. **Avian Diseases**, v. 47, p. 1466-1473, 2003.

SCHAT, K.A. Infectious anemia. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; FADLY, A.M.; CLISSON, J.R.; McDOUGALD, L.R.; SWAYNE, D.E. **Diseases of Poultry**. 11<sup>th</sup> ed. Ames: Iowa State University, 2003, p. 182-202.

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**, v. 37, p. 324-338, 1993.

SPACKMAN, E.; CLOUD, S.S.; POPE, C.R.; ROSENBERGER, J.K. Comparison of putative second serotype of chicken infectious anemia virus with a prototipical isolate I. Pathogenesis. **Avian Diseases**, v. 46, p. 945-955, 2002a.

SPACKMAN, E.; CLOUD, S.S.; ROSENBERGER, J.K. Comparison of putative second serotype of chiken infectious anemia virus with a prototipical isolate II. Antigenic and physicochemical characteristics. **Avian Diseases**, v. 46, p. 956-963, 2002b.

TANIGUCHI, T.; YUASA, N.; MAEDA, M.; HORIUCHI, T. Chronological observations on hemato-pathological changes in chicks inoculated with chicken anemia agent. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v. 23, p. 1-12, 1983.

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

TODD, D.; CREELAN, J.L.; MACKIE, D.P.; RIXON, F.; McNULTY, M.S. Purification and biochemical characterization of chicken anaemia agent. **Journal of General Virology**, v. 71, p. 819-823, 1990.

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

TODD, D.; SCOTT, A.N.J.; BALL, N.W.; BORGHMANS, B.J.; ADAIR, B.M. Molecular basis of the attenuation exhibited by moleculary 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, p. 169-174, 2004.

van SATEN, V.L.; Li, L.; HOERR, F.J.; LAUERMAN, L.H. Genetic characterization of chicken anemia virus from commercial broiler chickens in Alabama. **Avian Diseases**, v. 45, p. 373-388, 2001.

van SATEN, V.L.; JOINER, K.S.; MURRAY, C.; PETRENCO, N.; HOERR, F.J.; TORO, H. Pathogenesis of chicken anemia virus: comparison of the oral and the intramuscular routes of infection. **Avian Diseases**, v. 48, p. 494-504, 2004.

YAMAGUCHI, S.; IMADA, T.; KAJI, N.;MASE, M.; TSUKAMOTO, K.; TANIMURA, N.; YUASA, N. Identification of a genetic determinant of patogenicity in chicken anaemia virus. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1233-1238, 2001.

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 Diseases**, v. 45, p. 529-533, 2001.

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

YUASA, N.; NOGUCHI, K.; FURATA K.; YOSHIDA, I. Maternal antibody and its effect on the susceptibility of chicks to chicken anemia agent. **Avian Diseases.** v. 24, p. 197-201, 1980.