



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

DETECÇÃO DO TAsTV-2 (TURKEY ASTROVIRUS TYPE 2) EM PERUS
(*Meleagris gallopavo*)

SÉRGIO EUSTÁQUIO LEMOS DA SILVA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cardoso

UBERLÂNDIA-MG

2008



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**DETECÇÃO DO TAsTV-2 (*TURKEY ASTROVIRUS TYPE 2*) EM PERUS
(*Meleagris gallopavo*)**

SÉRGIO EUSTÁQUIO LEMOS DA SILVA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Tereza Cristina Cardoso

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética).

UBERLÂNDIA-MG

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S586d Silva, Sérgio Eustáquio Lemos da, 1974-
Detecção do TAsV-2 (Turkey astrovirus type 2) em perus
(*Meleagris gallopavo*) / Sérgio Eustáquio Lemos da Silva. - 2008.
61 f. : il.

Orientadora: Ana Maria Bonetti.
Co-orientadora: Tereza Cristina Cardoso.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Peru (Ave) - Doenças - Teses. 2. Doenças transmissíveis em animais - Teses. I. Bonetti, Ana Maria. II. Cardoso, Tereza Cristina. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 619:636.592

Elaborado pelo Sistema de Bibliotecas da UFU / Setor de Catalogação e Classificação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

DETECÇÃO DO TAsTV-2 (TURKEY ASTROVIRUS TYPE 2) EM PERUS
(*Meleagris gallopavo*)

SÉRGIO EUSTÁQUIO LEMOS DA SILVA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti (Orientadora)

Examinadores: Prof^a. Dr^a. Clarice Weis Arns (UNICAMP)

Prof. Dr. Paulo Gontijo Pinto Filho (UFU)

Data da Defesa: 28 / 02 / 2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas da PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas.

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti

Pela fé, entendemos que foi o universo formado pela palavra de Deus, de modo que o visível veio a existir das coisas que não são visíveis.

Hebreus 11:3

Meu tributo,

Eu tributo esse trabalho a Deus, que me deu a vitória de chegar até aqui.

Tudo o que tenho, tudo o que sou e o que vier a ter e a ser entrego a ti, Senhor!

Eu te amo, Pai!

“... Até aqui, nos ajudou o Senhor.”

I Samuel 7:12

Minha dedicatória,

Eu dedico esse trabalho a (aos):

Minha muito amada esposa, Suziani. Você é incomparável... Não há palavras para definir seu valor... Mulher sábia, adoradora e bela! Seu amor é melhor do que o vinho.... e seus conselhos me acalmam. Você tem me ensinado a excelência da vida, e a não desistir. Em você, eu encontrei tudo que Deus preparou para um homem. Eu te amo para sempre... Branca!

“O que acha uma esposa acha o bem e alcançou a benevolência do Senhor.”

Provérbios 18:22

Meus amados paizinhos, João e Iraci, por tudo que são, por tanto amor! Vocês são incomparáveis... Quanto amor, exemplo, dedicação e apoio! Definitivamente, vocês são únicos e amor igual aos seus, eu não conheço. Eu sei o sacrifício de vocês. Muito obrigado por tudo. Amo vocês.... contem comigo!

“Honra teu pai e tua mãe, para que se prolonguem os teus dias na terra.”

Êxodo 20:12

TRÊS AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À Prof^a. Dr^a. **Ana Maria Bonetti**, pela confiança, orientação, boa vontade, exemplo, amizade e apoio financeiro. Muito obrigado pela acolhida em seu laboratório. Admiro você!*

*À Prof^a. Dr^a. **Tereza Cristina Cardoso**, minha primeira e querida orientadora. Não tenho palavras para agradecer pela orientação, amizade, exemplo, parceria, acolhida, confiança e apoio financeiro. Sou, eternamente, grato a você. Você é meu referencial!*

*À minha avó **Anelita Lemos**, pelo o amor, apoio, torcida e apoio financeiro, por ter me ajudado a chegar até aqui. Você é incrível!*

AGRADECIMENTOS

*Ao Amado da minh'alma, **Deus**. Sem ti, não estaria aqui!*

*À amada da minh'alma, **Suziani**, por estar, incondicionalmente, sempre comigo, acreditar em mim, afagos e amor. Você é meu referencial de vida! Quando olho para você, vejo a Shekinah de Deus.*

*À minha muito amada filha, **Laura**, minha herança!*

*Aos meus pais, **João** e **Iraci**, por TUDO! Não tenho palavras para agradecer. É um privilégio ter vocês!*

*Aos meus sogros, **Demerval** e **Lourdes**, por serem uma benção para mim.*

*Aos meus amados, **Hébert** e **Jandra**, **Demerval Jr.** e **Marisa**, e **Tatiane**, por estarem sempre prontos a servir e pela torcida. Glória a Deus por vocês!*

*Aos meus queridos, **Hébert Fº.** e **Matheus**, por acreditarem em mim. Vocês, também, são herança!*

*Aos meus preciosos, **Tia Ana** e **Rafael**, pela sempre presença e instrumentos de benção.*

*À minha eterna, fiel e maravilhosa amiga **Marinês**, por fazer parte da minha história. Você é muito importante na minha vida!*

*Aos meus queridos, **Samuel** e **Noêmia Gomes**, pelo anúncio da Palavra que mudou meu caráter e a minha história. Aos meus preciosos amigos, **Diógenes** e **Fernanda**, companheiros de todas as horas. Valeu pela força!*

À **Dr^a. Adriana Petrocelli, Dr^a. Nelva Grando e Dr. Soncini**, pela preciosa colaboração na cessão das amostras de campo, sem as quais seria impossível realizar essa pesquisa.

À **Universidade Federal de Uberlândia e seus funcionários**.

À **Universidade Estadual de São Paulo – Campus de Araçatuba-SP**, Curso de Medicina Veterinária, Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal, pelo apoio no desenvolvimento desse projeto.

Ao **Instituto de Genética e Bioquímica**, seus **professores** (Profs. Warwick Estevam Kerr, Nilson Penha, Malcon Manfredi, Luiz Ricardo Goulart, Milton Vieira, Foued e Profas. Ana Maria Bonetti, Sandra Morelli, Veridiana Melo, Amélia Hamaguchi e Maria Inês Homs) e **funcionários** (Dona Norita, Marlene, Dalci, Gerson e Sr. Vilmar).

Aos **colegas do Laboratório de Genética**: Cinara, Rafael, Daniela, Carlos Ueira, Bel, Bôscoli, Renato, Carol, Tininha, Luciana Londe, Luciana Oliveira, Mila e Flávia, pela acolhida, ajuda e troca de informações em todos os momentos.

Aos **colegas do PGGB**: Neire Gouvêia, Carlos Prudêncio, Graciele Cristina (Veterinária), Guilherme, Ana Lúcia, Renata Cardoso, Shirlene e Cíntia (Psicologia), pela convivência e demonstrações de companheirismo.

À **CAPES e à FAPESP**, pelo apoio financeiro e incentivo à pesquisa.

Ao grupo de pesquisa da Prof^a. Tereza Cristina Cardoso, especialmente, **Heitor e M^a. Cecília Bacil**, pela preciosa colaboração nesse estudo.

Aos médicos veterinários: **Carolina Boldorini, Cíntia, Neurivan e Gutemberg**, pela disponibilidade e boa vontade nas coletas das amostras.

À **Mara Rúbia e ao Sineri**, pela atenção e cooperação.

Obrigado!

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia e no Laboratório de Virologia do Curso de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba-SP, e recebeu apoio financeiro das seguintes Entidades e Instituições:

- **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**
- **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**
- **Universidade Federal de Uberlândia (UFU)**
- **Universidade Estadual de São Paulo (UNESP) de Araçatuba-SP**

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	ii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ESQUEMA E FIGURAS.....	v
RESUMO GERAL.....	01
ABSTRACT.....	02
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	03
OBJETIVOS.....	15
MATERIAL E MÉTODOS.....	16
MATERIAL BIOLÓGICO.....	16
COLETA DE AMOSTRAS.....	16
DELINEAMENTO ESTATÍSTICO DAS COLETAS.....	16
HISTOPATOLOGIA.....	17
EXTRAÇÃO DO mRNA VIRAL.....	17
REAÇÃO DE RT-PCR.....	18
AMOSTRA DE VÍRUS DE REFERÊNCIA.....	20
ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	20
RESULTADOS.....	21
HISTOPATOLOGIA.....	21
REAÇÃO DE RT-PCR.....	23
DESCRIÇÃO DO QUADRO CLÍNICO.....	26
DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÕES.....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
ANEXOS.....	51
TRABALHO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO JVMS.....	51
LISTA DE REAGENTES.....	59
SOLUÇÕES E TAMPÕES.....	60
PROTOCOLOS PARA PREPARO DE SUSPENSÕES.....	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Microgramas
µm	Micrometros
µL	Microlitros
AstV	Astrovírus
AAstV	Astrovírus das Aves
ANV	Avian Nephritis Virus
B	Baço
BAstV	Astrovírus Bovino
BF	Bursa de <i>Fabrícius</i>
DAstV	Astrovírus dos Patos
EDTA	Etileno Diamino Tetra Acetato
FAstV	Astrovírus Felino
HAstV	Astrovírus Humano
HE	Hematoxilina-Eosina
IME	Imunomicroscopia eletrônica
Kb	Kilo base
kDa	QuiloDalton
MAstV	Astrovírus dos Mamíferos
ME	Microscopia eletrônica
MEM	Meio essencial mínimo
mM	Milimolar
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
OAstV	Astrovírus Ovino
OIE	Organização Internacional de Epizotias
ORF	Open Reading Frame
pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrílamida
PAstV	Astrovírus Suíno
PEMS	Poult Enteritis Mortality Syndrome

mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia pela polimerase com transcrição reversa
SC	Swab de cloaca
SDS-PAGE	Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrílamida
SLN	Sinal de localização nuclear
SRV	Small Round Virus
TAstV	Astrovírus dos Perus
T	Timo
TCoV	Coronavírus dos Perus
UBA	União Brasileira de Avicultura
UTR	Untranslated region
UV	Ultravioleta
VBI	Vírus da Bronquite Infecciosa
VPg	Proteína viral ligada ao genoma

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies descritas na família *Astroviridae* (pág. 05).

Tabela 2: Comprimentos genômicos dos *Astrovírus* das Aves (pág. 08).

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região da polimerase, capsídeo viral do TAstV-2 bem como da beta actina como *house keep gene* (pág. 19).

Tabela 4: Amostra de vírus entérico de referência negativa (pág. 20).

LISTA DE ESQUEMA E FIGURAS

Esquema 1: Representação esquemática da organização genômica do *Astrovirus* dos Perus (pág. 07).

Figura 1: Cortes histológicos de bursa de *Fabrícius*, baço e timo de perus acometidos de enterite (pág. 22).

Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos produtos das reações de RT-PCR (pág. 24).

Figura 3: Eletroforese em gel de agarose para a amplificação do gene da beta actina utilizado na presente investigação como gene *house keep* (pág. 25).

Figura 4: Aspectos clínicos e sanitários dos lotes estudados, pela técnica de RT-PCR, com diagnóstico positivo para TAsTV-2 (pág. 27).

Figura 5: Exame macroscópico de timos de perus acometidos de enterite, com diagnóstico positivo para TAsTV-2 pela RT-PCR (pág. 28).

Figura 6: Exame macroscópico de bursas de *Fabrícius* de perus acometidos de enterite, com diagnóstico positivo para TAsTV-2 pela RT-PCR (pág. 28).

Figura 7: Enterite severa e distensão de alças intestinais de perus acometidos de diarreia, com diagnóstico positivo para TAsTV-2 pela RT-PCR, indicadas pelo exame macroscópico (pág. 29).

RESUMO GERAL

O *Astrovírus* dos Perus Tipo 2 (TAsTV-2) é agente etiológico de uma doença emergente em perus, a *Poult Enteritis Mortality Syndrome* (PEMS), caracterizada por enterite severa, elevados índices de mortalidade, atrofia linfóide e imunossupressão em aves jovens, sendo responsável por sérios prejuízos financeiros à indústria avícola dos Estados Unidos. No Brasil, há necessidade de conhecimento sobre a ocorrência desses vírus nas diarreias das aves, sendo esse, um passo fundamental para o estabelecimento de medidas profiláticas específicas e para a exportação de produtos avícolas dentro das condições de sanidade. Este estudo teve por objetivos detectar TAsTV, pela técnica de RT-PCR dirigida aos genes codificadores da polimerase e capsídeo viral, em perus jovens de 30 a 45 dias de idade com quadro clínico de diarreia severa, imunossupressão, baixo desempenho zootécnico e mortalidade, caracterizar alterações histopatológicas em bursa de *Fabrácius* (BF), timo (T) e baço (B) e, por fim, comparar os resultados obtidos com os dados de literatura. O TAsTV-2 foi detectado em todas amostras de *swabs* cloacais (SC, n=100), 7 amostras de bursa de *Fabrácius* (BF, n=10) e em 10 amostras de timo (T, n=20) e baço (B, n=20). De 10 amostras de timo e baço negativas na primeira análise de RT-PCR, 5 foram positivas com o uso de *primers* específicos para o gene do capsídeo do TAsTV-2. Os exames histológicos revelaram ocorrência de atrofia, depleção linfóide, infiltração celular e necrose da BF, T e B, respectivamente. Esses resultados representam a primeira descrição do TAsTV-2 circulante em lotes comerciais de perus na América Latina.

Palavras-Chave: PEMS, TAsTV-2, enterite dos perus, RT-PCR e América Latina.

ABSTRACT

The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of turkey astrovirus (TAsV) capsid and polymerase gene was applied in the bursa of Fabricius (BF), thymus (TH), spleen (SP) and cloacal swabs (CS) from young poult with PEMS (Poult Enteritis Mortality Syndrome). The histological lesions were atrophy, lymphoid depletion, cellular infiltration and necrosis of BF, TH and SP, respectively. The RT-PCR reactions were positive in all of 100 CS, 7 out of 10 of BF, 10 out of 20 TH and SP, respectively, for the polymerase gene of TAsV-2. Five out of 10 TH and SP samples, considered as negative by RT-PCR, were positive when specific primers designed to the TAsV-2 capsid gene were applied. Finally, this is the first description of turkey astrovirus infection presenting PEMS in Latin America.

Key words: PEMS, TAsV-2, turkey enteritis, RT-PCR and Latin America

1. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A importância econômica e social da avicultura brasileira coloca o setor em evidência no âmbito nacional e internacional. O Brasil tem uma das aviculturas industriais mais desenvolvidas do mundo e, atualmente, se apresenta como um dos principais produtores e exportadores mundiais de carne de perus. Em 2006, foram exportados cerca de 156.000 toneladas de carne, o que representou 27% do comércio mundial e uma receita cambial de US\$ 152,3 milhões (Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura [UBA], 2006-2007). A exploração econômica das aves tem despertado interesse pela sua importância e avanços foram feitos no manejo sanitário e, hoje, podemos afirmar que a saúde dos plantéis brasileiros é comparável com a dos melhores do mundo.

O conhecimento dos fatores inerentes ao processo produtivo, bem como das enfermidades que assolam os rebanhos avícolas é fundamental para o desempenho da atividade. Em particular, o conhecimento sobre doenças do aparelho digestivo das aves industriais sofreu grande incremento nas duas últimas décadas, porém, estudos no Brasil, focados nesse tema são, até o momento, raros, sobretudo quando são considerados os processos de etiologia viral.

Doenças infecciosas que afetam a estrutura histológica do aparelho digestivo de aves comerciais são importantes, tanto em função das perdas econômicas que causam quanto pela afecção de outros sistemas, o que somado leva à diminuição da produtividade. Doenças desse tipo afetam o desempenho do lote, devido à diminuição do crescimento e da conversão alimentar, levando à não uniformidade do lote, ao aumento à susceptibilidade a outras doenças e, por fim, a uma elevação dos custos de medicação. Os efeitos deletérios persistem por muito tempo e, após a recuperação clínica, podem ocorrer altas taxas de mortalidade (BARNES, 1997).

Os vírus podem induzir alteração da mucosa intestinal, tornando-a porta de entrada para outros patógenos potenciais como, *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp e *Salmonella* spp. Aves afetadas podem desenvolver deficiências nutricionais, especialmente, aquelas relacionadas com as vitaminas lipossolúveis e minerais o que pode causar disparidade no crescimento e alterar o desenvolvimento de

órgãos linfóides, particularmente, a bursa de *Fabrícius* e timo, provocando patologias e aumento à susceptibilidade a doenças infecciosas (GUY, 1998).

Uma variedade de microrganismos pode alterar o ambiente da luz intestinal das aves, como as bactérias *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Clostridium* spp, e *Mycobacterium paratuberculosis* (POTTER, 1998), entretanto, os vírus são os mais prevalentes na maioria das infecções que tem impacto na sanidade e no desempenho do lote. Vírus pertencentes a diferentes famílias estão associados com quadros de enterite na avicultura doméstica, como membros das famílias *Coronaviridae*, *Reoviridae* e *Caliciviridae*, bem como os denominados de Pequenos Vírus Redondos (“Small Round Viruses” – SRV) associados às famílias *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Picornaviridae* e *Astroviridae* (GUY, 1998).

A detecção dos vírus que causam doenças entéricas em aves industriais, assim como o conhecimento da sua patogenia e epidemiologia são necessários para o desenvolvimento de medidas de profilaxia e controle adequadas. A Microscopia Eletrônica facilitou a identificação e associação de vírus com doenças intestinais nas aves, entretanto, a caracterização desses vírus tem sido uma tarefa árdua, já que a maioria é difícil ou impossível de ser cultivada usando procedimentos convencionais, *in vitro* (GUY, 1998).

Dentre os vírus que causam doenças entéricas estão os *Astrovírus* (AstVs) da família *Astroviridae*, que se dividem em dois gêneros: *Mamastrovírus* e *Avastrovírus*, cujas espécies são definidas de acordo com o animal hospedeiro como ilustra a Tabela 1 (KOCI e SCHULTZ-CHERRY, 2002).

Tabela 1 – Espécies descritas na família *Astroviridae* (Fonte: KOCI e SCHULTZ-CHERRY, 2002).

Espécie de Astrovírus	Abreviação
Astrovírus dos Mamíferos	MAstV
Astrovírus Bovino	BAstV
Astrovírus Bovino Tipo 1	BAstV-1
Astrovírus Bovino Tipo 2	BAstV-2
Astrovírus Felino	FAstV
Astrovírus Felino Tipo 1	FAstV-1
Astrovírus Humano	HAstV
Astrovírus Humano Tipo 1	HAstV-1
Astrovírus Humano Tipo 2	HAstV-2
Astrovírus Humano Tipo 3	HAstV-3
Astrovírus Humano Tipo 4	HAstV-4
Astrovírus Humano Tipo 5	HAstV-5
Astrovírus Humano Tipo 6	HAstV-6
Astrovírus Humano Tipo 7	HAstV-7
Astrovírus Humano Tipo 8	HAstV-8
Astrovírus Ovino	OAstV
Astrovírus Ovino Tipo 1	OAstV-1
Astrovírus Suíno	PAstV
Astrovírus Suíno Tipo 1	PAstV-1
Astrovírus das Aves	AAstV
Astrovírus dos Patos	DAstV
Astrovírus dos Patos Tipo 1	DAstV-1
Astrovírus dos Perus	TAstV
Astrovírus dos Perus Tipo 1	TAstV-1
Astrovírus dos Perus Tipo 2	TAstV-2
Astrovírus das Galinhas	CAstV
Astrovírus das Galinhas	ANV ¹

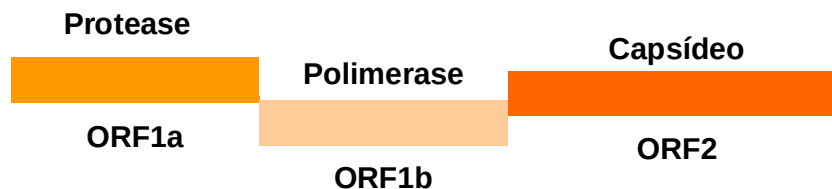
¹ANV: Avian Nephritis Virus (Vírus da Nefrite Aviária).

O gênero *Mamastrovírus* inclui oito tipos de *Astrovírus* Humano (HAstV), dois tipos de *Astrovírus* Bovino (BAstV) e os que acometem suínos (PAstV), felinos (FAstV) e ovinos (OAstV). O gênero *Avastrovírus* compreende os AstVs que infectam aves como patos (DAstV), perus (TAstV-1 e TAstV-2) e galinhas (ANV – Vírus da Nefrite Aviária) (LUKASHOV e GOUDSMIT, 2002; MATSUI e GREENBERG, 2001; WALTER e MITCHELL, 2003).

Os AstVs são vírus pequenos, arredondados, com diâmetro de 28-30 nm, não envelopados e possuem um capsídeo icosaédrico composto por, pelo menos, três proteínas de 35 a 22 kDa (BASS e QIU, 2000; BASS e UPADHYAYULA, 1997; MATSUI e GREENBERG, 2001). O nome *Astrovírus* vem de "*astron*" (Grego, para estrela) que significa projeções, na superfície viral, de cinco a seis pontas, semelhante à forma de estrela, usualmente visualizada pela Microscopia Eletrônica (ME) (MADELEY e COSGROVE, 1975). A visualização da estrutura '*star-like*' definitiva é dependente do potencial hidrogeniônico e pode variar de acordo com os protocolos de isolamento, sendo observada somente em 10% das partículas virais quando visualizadas sob ME ou quando submetidas a soluções alcalinas concentradas (MATSUI e GREENBERG, 2001; RISCO *et al.*, 1995; CAUL e APPLETON, 1982).

Em relação ao genoma, os AstVs possuem RNA (ácido ribonucleico) de fita simples de polaridade positiva, com aproximadamente 6,8 a 7,9 kb de comprimento (MATSUI e GREENBERG, 2001). A sequência completa de cinco isolados de HAstV (nº. de acesso ao *Genbank*: AF141381 e AF260508), dos dois TAstVs, do ANV e do OAstV estão disponíveis nos Bancos de Dados. Em geral, a organização genômica básica e a estratégia de replicação são conservadas e similares entre todos os AstVs seqüenciados.

A organização genômica do *Astrovírus* dos Perus (TAstV) inclui uma região não traduzida ("Untranslated Region" – UTR) na extremidade 5', seguida por três regiões de leitura aberta ("Open Reading Frames" – ORFs) e uma região UTR seguida de uma cauda poliadenilada (PoliA) na extremidade 3' (KOCI *et al.*, 2000; KOCI e SCHULTZ-CHERRY, 2002) como ilustra o Esquema 1.



Esquema 1 – Representação esquemática da organização genômica do *Astrovírus* dos Perus (Fonte: KOCI *et al.*, 2000b).

Embora a organização do genoma e a estratégia de replicação sejam conservadas e similares entre todos os AstVs seqüenciados, o tamanho de cada componente pode variar entre as espécies e sorotipos. Entre os três *Astrovírus* das Aves (AAstVs) seqüenciados, além da variação no comprimento total de seus genomas (Tabela 2) observa-se, também, variação em seus componentes internos e nas estratégias de expressão para a ORF2. Análises das seqüências desses componentes revelaram uma estrutura de RNA altamente conservada, composta por 35 nucleotídeos, localizada próximo ao códon de parada da ORF2, denominada de s2m. A s2m está presente em todos AstVs isolados (inclusive nos MAstVs) exceto no TAstV-2 (JONASSEN *et al.*, 1998). Esse domínio conservado está presente, também, no Vírus da Bronquite Infecciosa (um *Coronavírus* grupo 3) e no *Rhinovírus* Equino Tipo 2 (um *Picornavírus*), fato que os autores apontam como evidência de eventos de recombinação entre esses vírus (JONASSEN *et al.*, 1998).

Tabela 2 – Comprimentos genômicos dos *Astrovírus* das Aves. (Fonte: KOCl e SCHULTZ-CHERRY, 2002).

Astrovírus das Aves	Número de Nucleotídeos					
	5' UTR	ORF 1a	ORF 1b	ORF 2	3' UTR	Total ¹
ANV	14	3012	1527	2052	305	6927
TAstV-1	11	3300	1539	2016	130	7003
TAstV-2	21	3378	1584	2175	196	7325

¹Excluiu a cauda poliA.

A ORF apresenta as regiões ORF1a, ORF1b e ORF2, cada uma delas codificando, pelo menos, uma poliproteína viral (GEIGENMÜLLER *et al.*, 2002; MÉNDEZ *et al.*, 2002; MÉNDEZ *et al.*, 2003). As regiões ORF1a e ORF1b codificam para as proteínas não-estruturais serina protease e polimerase viral, respectivamente.

A serina protease é a proteína melhor descrita, codificada na ORF1a, a qual apresenta semelhanças com proteases quimotripsina-*like* de outros vírus RNA de sentido positivo, no entanto, difere dessas por apresentar um resíduo de cisteína em vez de serina no terceiro sítio catalítico (GORBALENYA *et al.*, 1989; MATSUI e GREEMBERG, 2001). Em alinhamento de seqüências peptídicas dessa protease entre AAstV (Aves) e MAstV (Mamíferos) observa-se um resíduo mutante (ácido aspártico) no segundo sítio catalítico, cuja significância é desconhecida. No entanto, os resíduos de serina se alinham, bem como outros domínios importantes na ligação do substrato (KOCl e SCHULTZ-CHERRY, 2002). Além da serina protease, a ORF1a codifica outras duas proteínas não estruturais identificadas como hélices de transmembrana e um sinal de localização nuclear (SLN) cujas funções, ainda, não são bem esclarecidas. Vários estudos descrevem uma “mancha” nuclear limitada para antígeno de AstVs associada à SLN (AROONPRASERT *et al.*, 1989; WILLCOCKS *et al.*, 1999). A

presença de seqüências de aminoácidos (motivos proteicos) para SLN foram encontrados em TAstVs e em ANV (IMADA *et al.*, 2000).

A ORF1a codifica, ainda, para outras proteínas não-estruturais, que ainda não foram identificadas. Análises seqüenciais de todos os AstVs não identificaram a presença de uma proteína viral ligada ao genoma (VPg) ou de uma helicase, ambas consideradas, convencionalmente, essenciais (WILLCOCKS *et al.*, 1994; GIBSON *et al.*, 1998; MATSUI e GREEMBERG, 2001).

A ORF1a é mais conservada entre os HAstVs, fato não observado nos AAstVs seqüenciados até o momento (BELLIOT *et al.*, 1997). Caracteristicamente, há maior relação entre os HAstVs do que entre os AAstVs. Esse fato pode indicar que as proteínas não-estruturais dos AAstVs possuem maior flexibilidade de variação gênica do que os seus equivalentes em mamíferos e pode estar relacionado a diferenças na escala de hospedeiros (SCHNEIDER e ROOSSINCK, 2001) visto que, para os MAstVs, não há nenhuma evidência de infecção cruzada; em contrapartida, estudos epidemiológicos em plantéis de galinhas e perus relataram a detecção de anticorpos anti-ANV nas duas espécies, sugerindo que ambas suportam a replicação do ANV (NICHOLAS *et al.*, 1988; CAVANAGH, 1992). De acordo com Schneider e Rossinck (2001), uma maior flexibilidade genética pode aumentar a probabilidade de replicação em todas as espécies avícolas susceptíveis, desde que todo o motivo funcional seja conservado. Observa-se, também, que a similaridade de seqüência da ORF1a entre os AAstVs e os MAstVs é muito baixa, com identidade nucleotídica que varia de 20 a 25% (12 a 15% de aminoácidos) (KOCI e SCHULTZ-CHERRY, 2002).

A ORF1b é a mais conservada entre os AAstVs e MAstVs, bem como entre os AAstVs. Para essa região, os TAstVs apresentam maior similaridade com os HAstVs (em torno de 35 a 38%), o que confirma que as polimerases são as proteínas melhor conservadas dos AstVs (KOCI *et al.*, 2000a; KOCI e SCHULTZ-CHERRY, 2002).

Análises filogenéticas da ORF2, de todos os AstVs, demonstraram que os MAstVs estão mais relacionados do que os AAstVs (JONASSEN *et al.*, 2001) e que a porção N-terminal do gene do capsídeo é mais conservado do que a porção C-terminal (JONASSEN *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2001).

Os AstVs, devido a sua caracterização morfológica, estão incluídos juntamente com os *Enterovírus*, *Parvovírus* e *Calicivírus* no grupo dos SRVs, os quais estão associados à enterite em mamíferos e aves. O termo SRV tem sido usado para designar vírus pequenos similares que são detectados por ME mas que, geralmente, não podem ser identificados por critérios morfológicos (CAUL e APPLETON, 1982; YU *et al.*, 2000).

Os *Astrovírus* das aves (AAstVs), em particular, causam doenças hospedeiro-específicas de grande importância econômica, com descrições de quadros de gastroenterite aguda em perus e de nefrite aguda, nas galinhas. Na maioria das espécies hospedeiras os sintomas são brandos e auto-limitantes, porém, quadros mais severos têm sido descritos na avicultura (MATSUI e GREENBERG, 2001).

Nos Estados Unidos, o TAstV é, comumente, conhecido como causador de uma enfermidade infecciosa em perus, com prevalência alta. As infecções são, normalmente, observadas durante as primeiras quatro semanas de idade, com aumento moderado na mortalidade (REYNOLDS *et al.*, 1987b; REYNOLDS *et al.*, 1987a; KOCI e SCHULTZ-CHERRY, 2002).

O primeiro relato de AstVs em perus é de 1980, no Reino Unido, associado a aves jovens (6 a 11 dias de idade) que sucumbiram a um quadro de diarreia, com mortalidade elevada (MCNULTY *et al.*, 1980). Desde então, vários relatos de surtos de AstVs em perus, principalmente, relacionados à enterite e baixo crescimento foram descritos (REYNOLDS e SAIF, 1986). Na década de 80, estudos identificaram um TAstV do Tipo 1 (*Turkey Astrovirus Type 1*: TAstV-1) e demonstraram ampla distribuição desse sorotipo em lotes nos Estados Unidos (SAIF *et al.*, 1985; REYNOLDS e SAIF, 1986; REYNOLDS *et al.*, 1987b). Reynolds *et al.* (1987b) isolaram o TAstV em 78% dos lotes doentes. Em pesquisas de rebanhos comerciais de perus com quadro de enterite, os AstVs foram os vírus mais comumente detectados, evidenciando que o TAstV é um importante agente de enterite de aves jovens (REYNOLDS e SCHULTZ-CHERRY, 2003; TANG *et al.*, 2005b).

Em 1996, Koci *et al.* (2000a) isolaram e caracterizaram um TAstV associado à Síndrome da Mortalidade e Enterite dos Perus ("Poult Enteritis

Mortality Syndrome” – PEMS) nos Estados Unidos, o qual é genética e imunologicamente distinto do TAstV-1, descrito anteriormente.

Esse TAstV, então denominado TAstV do Tipo 2 (*Turkey Astrovirus Type 2: TAstV-2*) foi, originalmente, isolado de timo de perus infectados (SCHULTZ-CHERRY *et al.*, 2000). Experimentalmente, foi demonstrado que, além de enterite, o TAstV-2 causa atrofia em timo (T) e bursa de *Fabrícius* (BF) e alta mortalidade em perus jovens e que, apesar de poder ser isolado em tecidos linfóides, a replicação é, regularmente, detectada nos intestinos (BEHLING-KELLY *et al.*, 2002).

Os genomas de ambos os vírus, TAstV-1 e TAstV-2, foram seqüenciados e demonstrado que esses dois vírus estão distantes do ponto de vista genético (JONASSEN *et al.*, 2003; KOCI *et al.*, 2000; SCHULTZ-CHERRY *et al.*, 2001).

A PEMS é uma doença entérica emergente, que acomete perus jovens, de caráter altamente infeccioso, que ocasiona sérias perdas financeiras à indústria do setor. Clinicamente, a PEMS é definida por perfis variados de mortalidade, diarreia, baixo crescimento e imunossupressão. O maior impacto da PEMS é decorrente da mortalidade e queda de produção, pois, as aves acometidas por essa desordem entérica apresentam atrofia muscular (“refugagem”) e baixo ganho de peso (BARNES e GUY, 1997). Desde a sua emergência, surtos de PEMS têm custado à indústria americana de perus, milhões de dólares anuais (PANTIN-JACKWOOD *et al.*, 2006a).

Tentativas de reproduzir PEMS com um único agente não foram bem sucedidas, sugerindo que seja uma doença multifatorial ou que o agente único, ainda não foi isolado e identificado. Embora muitos vírus, bactérias e parasitas sejam encontrados em aves acometidas pela doença, o agente inicial permanece desconhecido. Além disso, a habilidade de diferentes vírus e bactérias em apresentar sinais clínicos de PEMS, dificulta a identificação de um agente específico (BARNES e GUY, 2003).

Co-infecções entre TAstV e TCoV (*Coronavírus* dos Perus) são comuns em perus e causam um impacto sinérgico negativo sobre as funções de absorção do intestino, sendo sugeridas como um dos fatores causadores da PEMS (ISMAIL *et al.*, 2003). Suspeita-se que essas co-infecções possam predispor a infecções por

outros patógenos, denominados de “oportunistas”, tais como, *Escherichia coli* e outros agentes (QURESHI *et al.*, 2000; BARNES e GUY, 1999).

O TAsTV é eliminado nas fezes de aves infectadas, com transmissão horizontal a partir de ingestão de fezes contaminadas e de materiais contaminados com fezes e, pode ser transmitido, rapidamente, no plantel ou de um plantel a outro. Os principais transmissores mecânicos do vírus são o homem, equipamentos e veículos, assim como aves selvagens, roedores, cães e insetos (GUY, 2003).

Esses vírus são extremamente estáveis ao meio ambiente e resistentes à inativação pela maioria dos desinfetantes usados rotineiramente em aviários. De acordo com pesquisas realizadas, os únicos produtos completamente efetivos em inativar o TAsTV são formaldeído 0,3%, β -propiolactona 0,1%, peroximonosulfato 1,5% e metanol 90% (SCHULTZ-CHERRY *et al.*, 2001; KURTZ *et al.*, 1980).

O controle efetivo da PEMS está baseado na redução da população de lotes doentes e na desinfecção cuidadosa de instalações, para prevenir a doença em lotes subseqüentes alojados. O uso de formaldeído é considerado, atualmente, o melhor procedimento na desinfecção de aviários, além das medidas habituais de biossegurança aplicadas à avicultura moderna (BARNES *et al.*, 1997; BARNES *et al.*, 1996; EDENS e DOERFLER, 1999).

A escassez de relatos envolvendo a resistência do TAsTV a desinfecções pode ser explicada pela dificuldade de se cultivar esse vírus em cultura celular, pois pode ser propagado apenas por passagens orais em seus hospedeiros ou, em alguns casos, por passagens seriadas em ovos embrionados de perus (REYNOLDS e SCHULTZ-CHERRY, 2003).

Pouco é conhecido sobre a infecção do TAsTV em perus e o desenvolvimento de testes diagnósticos torna-se fundamental para determinação da prevalência desse agente nos rebanhos, bem como para detecção do vírus circulante no campo.

Até recentemente, a Microscopia Eletrônica (ME) era o método mais usado para identificar infecção em aves (REYNOLDS, 1991). Apesar de ser um procedimento rápido e não exigir partículas virais viáveis, essa técnica requer alta concentração de vírus no espécime clínico e as imagens virais detectadas podem compartilhar características comuns com outros agentes virais (MADELEY, 1993;

MATSUI e GREENBERG, 2001). Além disso, apenas 10% das partículas podem exibir a morfologia *star-like*. A ME é pouco sensível e exige, ainda, experiência e interpretação acurada por parte do responsável pelo procedimento (TANG *et al.*, 2005b).

Devido a essas limitações, Reynolds (1991) sugeriu o uso da Imuno-Microscopia Eletrônica (IME) para possibilitar a agregação viral, porém, a adição de anticorpo purificado ou soros convalescentes à amostra viral pode mascarar as características físicas ou falhar em detectar novos sorotipos. A IME pode ser uma ferramenta efetiva de diagnóstico se o complexo antígeno-anticorpo for caracterizado completamente (MATSUI e GREENBERG, 2001).

Sendo assim, ensaios com anticorpos fluorescentes e RT-PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase com Transcrição Reversa) se tornaram mais viáveis e mais aplicados, porém, testes com anticorpos fluorescentes podem falhar em reconhecer diferentes sorotipos (KOCI *et al.*, 2003; SELLERS *et al.*, 2004; MATSUI e GREENBERG, 1996).

A introdução de métodos de detecção molecular no diagnóstico de enterite viral levou a um novo entendimento em relação à etiologia das infecções por AstV em perus. Koci *et al.* (2000b) relataram, com êxito, o emprego da RT-PCR na detecção específica das regiões do gene da polimerase e capsídeo do TAstV em rebanhos comerciais de perus, nos EUA. Mais recentemente, a aplicação de RT-PCR utilizando *primers* de Controle Interno (CI) com alvo no gene da polimerase, revelou boa sensibilidade na detecção do vírus em lotes acometidos de PEMS na Carolina do Norte, além de superioridade em relação à ME (TANG *et al.*, 2005b).

Dados sobre a circulação e a caracterização de TAstV em perus, fora dos EUA, são pouco descritos na literatura. Culver *et al.* (2006) demonstraram, pela primeira vez, a associação entre TAstV-2 e TCoV em lotes de perus com quadro de PEMS, na Inglaterra. A detecção recente de um AstV, geneticamente relacionado ao TAstV-2 em galinhas d'Angola na Itália, sugere que perus não representam a única população alvo para o TAstV e que a infecção não está restrita aos EUA (CATOLLI *et al.*, 2005).

Síndromes entéricas causadas pelos SRVs foram, também, descritas em galinhas d'Angola (*Numida meleagris*) e observou-se que uma enterite altamente

transmissível, associada com enterovírus, é a causa de uma doença severa nessa espécie (PASCUCCI e LAVAZZA, 1994).

Em decorrência da falta de informações sobre a presença de TAsTV no Brasil, o presente estudo teve por objetivo verificar a ocorrência de TAsTV em materiais clínicos: *swabs* cloacais e suspensão de tecidos linfóides (bursa de *Fabricius*, baço e timo) de perus (*Meleagris gallopavo*) com quadro de enterite, por meio da técnica de RT-PCR para as regiões dos genes do capsídeo e da polimerase viral, respectivamente. As reações de PCR foram acompanhadas quanto a sua especificidade pela amplificação do gene beta-actina, também conhecido como *house-keep* gene ou normalizador interno de reação.

2. OBJETIVOS

- 2.1. Detectar, pela reação de RT-PCR direcionada à região da polimerase e capsídeo viral, a expressão do mRNA de um TAsTV, em *swabs* cloacais e suspensões teciduais de bursa de *Fabrácius*, timo e baço de perus (*Meleagris gallopavo*) de 30 a 45 dias, com quadro clínico de enterite, provenientes de granjas comerciais da Região do Triângulo Mineiro.
- 2.2. Caracterizar alterações histopatológicas em órgãos linfóides como, bursa de *Fabricíus*, timo e baço, associadas à sintomatologia clínica de enterite, em perus de 30 a 45 dias.
- 2.3. Comparar dados de histopatologia, detecção de mRNA viral e as observações clínicas gerados pelo presente estudo em *Meleagris gallopavo*, com os dados de literatura.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética da Universidade Federal de Uberlândia e no Laboratório de Virologia do Curso de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba-SP, em um trabalho de colaboração.

3.1. Material biológico

Para obtenção das amostras clínicas, foram estabelecidos contatos com uma empresa produtora de perus na Região do Triângulo Mineiro, em Minas Gerais, que cedeu, gentilmente, o material para levantamento de ocorrência de *Astrovírus* em perus (*Meleagris gallopavo*) de seu plantel.

3.2. Coleta das amostras

Veterinários da empresa coletaram as amostras de campo em lotes de perus com idade entre 30 a 45 dias, perfazendo um total de 5 coletas de 4 lotes diferentes. As aves apresentavam sinais de elevada morbidade e mortalidade, com quadro clínico de severa enterite e desidratação, notificados pela equipe técnica da empresa. Para análise virológica, o material, enviado ao laboratório, consistiu de *swabs* da região cloacal (SC), acompanhados de fragmentos de 2 g de tecidos de bursa de *Fabrícius* (BF), baço (B) e timo (T), respectivamente (CAVANAGH *et al.*, 2001).

3.3. Delineamento estatístico das coletas

O número de amostras coletadas foi determinado pelo programa estatístico SAS (*Statistical Analysis System*) e calculado segundo o manual *Principles of*

Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases (JACOBSON, 1996) da Organização Internacional de Epizootias (OIE). O número estipulado foi de cem (n=100) amostras para SC, dez (n=10) para BF e vinte (n= 20) para B e T.

3.4. Histopatologia

Os fragmentos de bursa de *Fabrícius*, timo e baço foram fixados em formol tamponado (pH 7,2) a 10%, desidratados, diafinizados, embebidos e incluídos em parafina e cortados em espessura de 4 a 5 μ m em micrótomo (Leyca[®]), pelo Setor de Patologia do Curso de Medicina Veterinária, UNESP de Araçatuba-SP. As lâminas foram coradas pela Hematoxilina-Eosina (HE) e, posteriormente, analisadas ao microscópio óptico, por dois patologistas diferentes.

3.5. Extração do mRNA viral

3.5.1. Swabs de cloaca

Swabs cloacais individuais (n=100) foram imersos em 0,2 mL de uma solução de lise contendo 10 μ g/mL de proteinase K e aquecidos por 30 min a 37°C em banho-maria. Em seguida, foram centrifugados a 3.000 g e as suspensões recuperadas para a extração do mRNA. As suspensões com o mRNA viral foram submetidas ao protocolo de extração do mRNA pelo método TRIzol[®] (InvitrogenTM) em uma única etapa, com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (50:49:1). Após centrifugação a 12.000 g a 4°C por 10 min, o sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo o RNA total foi lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado novamente a 7500 g, a 4°C por 5 min. Após a secagem do *pellet*, o RNA total foi ressuspendido em 30 μ L de EDTA 1 mM (pH 7,0) e armazenado a -86°C. Para evitar problemas decorrentes da instabilidade do RNA, a reação de RT-PCR foi processada em seguida.

3.5.2. Amostras teciduais de bursa de *Fabrácius*, baço e timo

Suspensões individuais de bursa (n=10), timo (n=20) e baço (n=20) foram preparadas com meio de cultura MEM (Meio Essencial Mínimo) adicionado de 20 µg de proteinase K (GIBCO®-BRL), na proporção de 2 g de tecido para 3 mL de MEM. Após a trituração mecânica, a suspensão foi centrifugada a 3.500 g por 20 min. O sobrenadante foi recolhido em tubo cônico de 15 mL e filtrado uma vez em papel de filtro de 0,75 µm (Millipore®) e, em seguida, submetido a duas filtrações em filtros de seringa de 0,45 µm e 0,25 µm (Corning®) por duas vezes consecutivas, para retirada dos *debris* celulares. As amostras foram alicotadas, identificadas e armazenadas em freezer (Sony®) a -86°C para posterior extração de RNA. A extração do RNA total seguiu o protocolo descrito no item 3.5.1.

3.6. Reação de RT-PCR para detecção em amostras clínicas

As regiões do genoma viral escolhidas para análise foram os genes da polimerase e do capsídeo viral do *Astrovírus* dos Perus.

Os dois jogos de *primers* utilizados foram retirados de trabalhos anteriores e denominados MKPOL10/MKPOL11 e TAsT_Cap_F/TAsT_Cap_R (KOCI *et al.*, 2000b; CATOLLI *et al.*, 2006). O primeiro conjunto, MKPOL10 e MKPOL11, foi desenhado baseado na sequência nucleotídica do TAsTV (nº. *Genbank*: AF206663), sendo específico para a região da polimerase, com um produto esperado de 802 pb. O segundo par de oligonucleotídeos, TAsT_Cap_F e TAsT_Cap_R, são direcionados ao gene do capsídeo viral do TAsTV-1 (nº. *Genbank*: Y15936) e TAsTV-2 (nº. *Genbank*: AF206663), cujos produtos esperados são de 226 pb e 222 pb, respectivamente. Um controle interno da RT-PCR, constituído pelos *primers* Beta_Actin_F e Beta_Actin_R (nº. *Genbank*: X00182), foi aplicado direcionado ao gene beta actina de *Meleagris gallopavo*, cujo produto esperado é de 400 pb (Tabela 3).

Em cada reação foram utilizados 2 µL de RNA para um volume final de 25 µL/reação, como preconizado no Kit comercial Superscript™III One-Step RT-PCR com Platinum® *Taq* (Invitrogen®). As reações de PCR foram realizadas nas

seguintes condições: 94°C/5 minutos, 60°C/30 minutos e 94°C/1minuto, seguido de 40 ciclos de: 94°C/15 segundos, 55°C/30 segundos e extensão final por 68°C/10 minutos, em termociclador MJ Research.

Os produtos foram separados em gel Agarose 1,5%, corado com Brometo de Etídeo (0,5 µg/mL) visualizados sob luz UV (Ultravioleta) e documentados pelo sistema KODAKDC290 Digital Câmera. Para controle interno de cada reação de RT-PCR realizada, foi empregado o gene da beta actina, um gene constitutivo com o número de acesso X00182 no *GenBank*.

Tabela 3 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região da polimerase, capsídeo viral do TAsTV-2 e o gene da beta actina, como *house keep gene* (constitutivo) em perus (*Meleagris gallopavo*).

Iniciadores	Seqüência (5'→3')	Gen
TAsTV_Cap_F	GGAAAATCTTTGGRGCMGCA	ORF2
TAsTV_Cap_R	CTTGTGGTAGTGGCAAATAG	ORF2
MKPol10	TGGCGGCGAACTCCTCAACA	3' ORF1b
MKPol11	AATAAGGTCTGCACAGGTCG	3' ORF1b
Beta <i>actin</i> F	AAGATCTGGCACCACACTTTC	Beta actina
Beta <i>actin</i> R	ACAGTCTCTCCTTGATGTCAC	Beta actina

3.7. Amostra de vírus de referência

Pelo fato de não existir um exemplar de TAsTV disponível no Brasil, não foi usado controle de referência positiva da RT-PCR a fim de verificar a especificidade. Outro RNA vírus, o Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI), um *Coronavírus* do grupo 3, foi incluído como controle negativo (Tabela 4), bem como, água MilliQ ultrapura (GUY *et al.*, 2004; PANTIN-JACKWOOD *et al.*, 2006a; PANTIN-JACKWOOD *et al.*, 2006b).

Tabela 4 – Amostra de vírus entérico de referência negativa – Laboratório de Virologia da UNESP de Araçatuba/SP – 2007.

Vírus	Amostra Padrão	Origem/Manutenção
<i>Coronavírus</i> do grupo 3	IBV sorotipo M41	Ovos embrionados de galinha

3.8. Análise estatística dos resultados

A frequência das alterações histológicas e a positividade dos resultados obtidos pela técnica de RT-PCR foram comparadas pelo Teste Exato de Fisher. A intensidade das alterações histológicas e os sinais clínicos foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis e pelo teste não paramétrico de Spearman, através do *software* SAS (TEIXEIRA *et al.*, 2007).

4. RESULTADOS

Os resultados do presente trabalho correspondem à detecção do TAsTV em materiais clínicos de *swabs* cloacais (n=100) e respectivas suspensões teciduais de bursa de *Fabrícius* (n=10), timo (n=20) e baço (n=20) de *Meleagris gallopavo*, pelo uso da técnica de RT-PCR.

4.1. Histopatologia

Nas aves acometidas por sintomas de enterite aguda, dos fragmentos de bursa de *Fabrícius* (n=10) analisados, todos apresentaram destruição leve à moderada do parênquima dos folículos linfóides acompanhado de rarefação linfocitária, principalmente, na região medular. Foi observada uma população celular composta, predominantemente, de células jovens e imaturas, acompanhada de atrofia, necrose e presença de heterófilos (Figura 1A). Os cortes histológicos de timo (n=20), também, em sua totalidade demonstraram sinais de rarefação celular com focos de intensa necrose na região medular (Figura 1C). Em contrapartida, os padrões de lesões evidenciados no timo não foram os mesmos vistos nos cortes de baço. As alterações observadas no baço foram caracterizadas por extensas áreas inflamatórias focais e intensa infiltração de monócitos nas polpas branca e vermelha, com focos de necrose (Figura 1B).

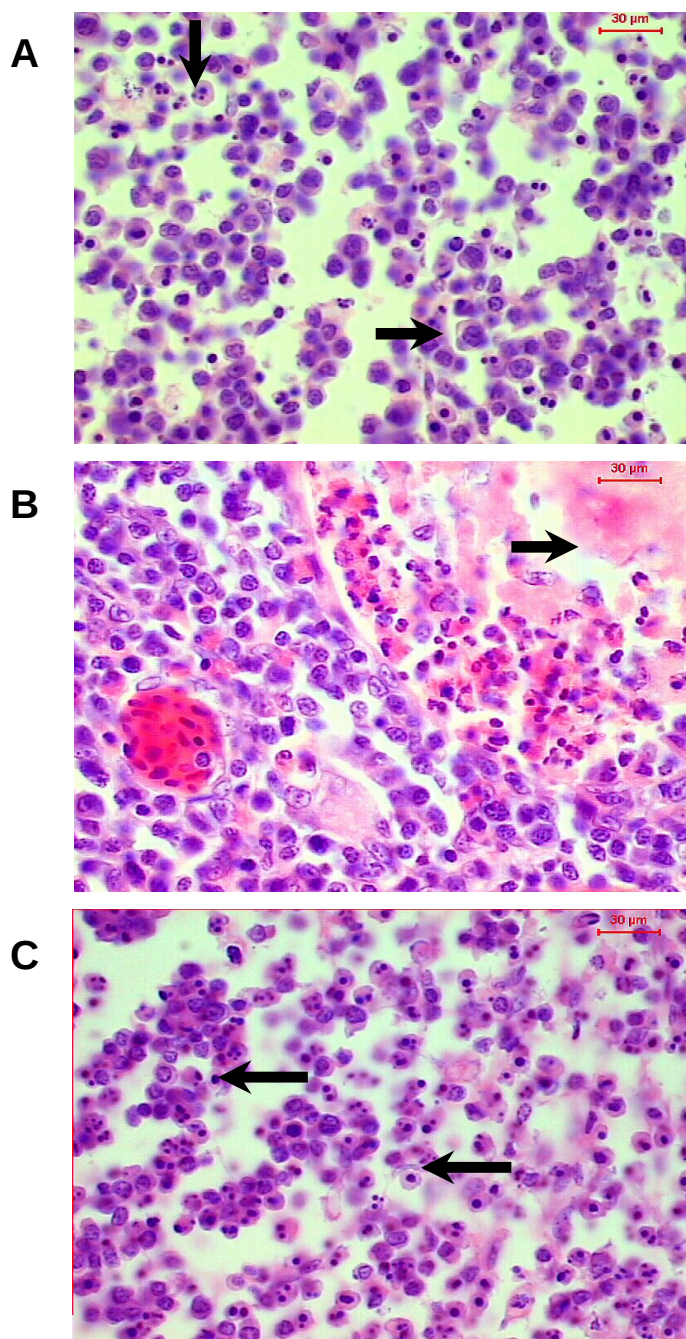


Figura 1 – Cortes histológicos de bursa de *Fabrácius*, baço e timo de perus acometidos de enterite. **A)** Bursa de *Fabrácius*: infiltrado monocitário (seta) e presença de heterófilos (seta); **B)** Baço: intensa necrose (seta) e reação inflamatória; **C)** Timo: depleção tímica e presença de heterófilos (setas). (H-E, Bar = 0.030 µm, 100X).

4.2. Reação de RT-PCR

Os produtos esperados, com tamanhos de 802 pb e de 222 pb, respectivamente, foram considerados positivos para o TAstV (Figura 2A, 2B e 2C).

A RT-PCR para o gene da polimerase viral (ORF1b) confirmou a presença de TAstV em todas as amostras de *swab* cloacal (n=100) processadas. Com relação às amostras de bursa de *Fabrícius* (BF), sete (7) do total de dez (10) analisadas foram consideradas positivas para TAstV, e dez (10) do total de vinte (20) amostras de timo (T) e baço (B) foram interpretadas como positivas para a mesma análise. Essas amostras originaram uma banda de 802 pb amplificada pelo conjunto de oligonucleotídeos MKPOL10/MKPOL11, confirmando a amplificação do gene da polimerase viral do TAstV (Figura 2A e 2C).

Os produtos amplificados 802 pb do gene da polimerase, referentes às amostras positivas para o TAstV foram submetidos ao seqüenciamento direto, no Laboratório de Estudos Genômicos de São José do Rio Preto, UNESP, confirmando, dessa forma, a presença do *Astrovírus* Tipo 2 (TAstV-2). As seqüências foram alinhadas com o programa ClustalW e comparadas pelo programa BLAST. As seqüências nucleotídicas, na região de alinhamento, apresentaram uma identidade de 98% entre o TAstV encontrado e o TAstV-2 isolado na Carolina do Norte, variante Q/34/1990, confirmando a identidade dos produtos amplificados como o gene da polimerase relacionado à ORF1b do TAstV-2 (dados não mostrados).

O segundo conjunto de oligonucleotídeos, TAst_Cap_F/TAst_Cap_R, direcionado ao gene do capsídeo, amplificou cinco (5) produtos de 222 pb (Figura 2B) em dez (10) amostras de timo e baço, consideradas negativas pelos *primers* MKPOL10/MKPOL11.

As reações referentes ao controle negativo (Vírus da Bronquite Infecciosa e água MilliQ ultrapura) não apresentaram quaisquer bandas na eletroforese (Figura 2B e 2C). Para o controle interno da reação RT-PCR, o gene beta actina, utilizado

em todas as reações, revelou o bom desempenho da RT-PCR empregada (Figura 3A e B).

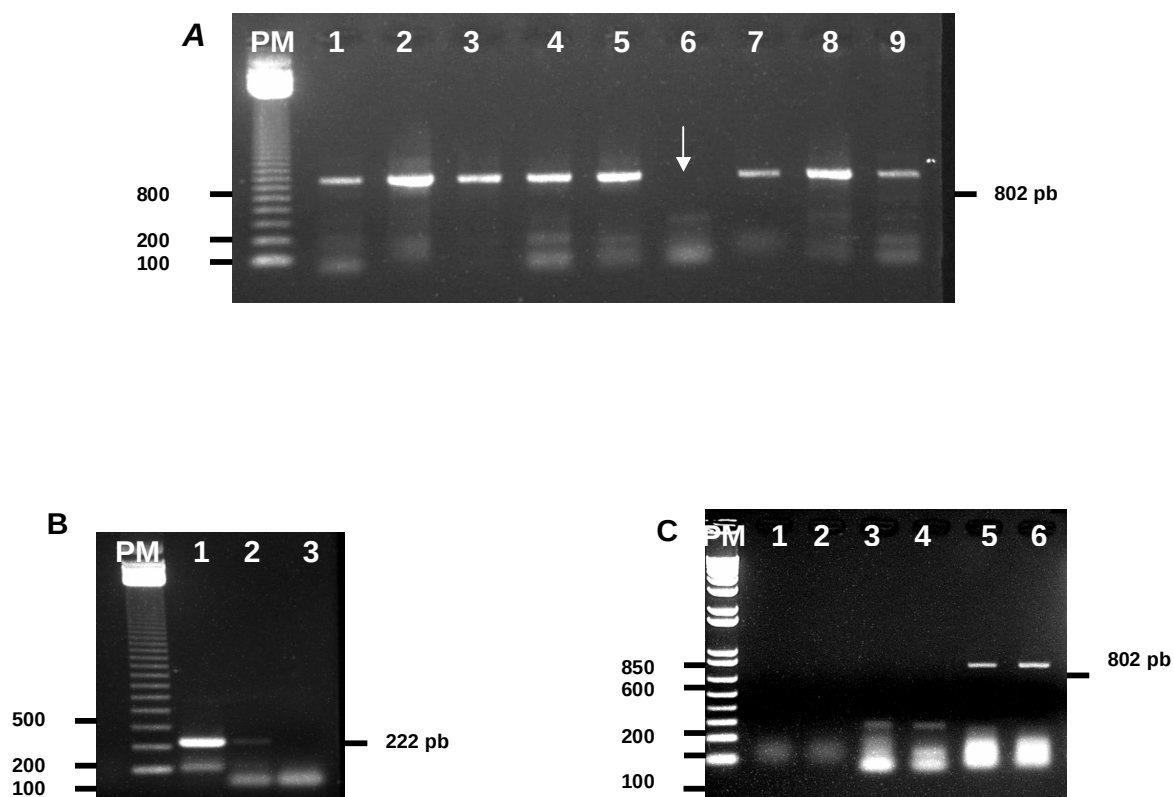


Figura 2 – Produtos das reações de RT-PCR. **A)** Produtos amplificados pelos *primers* MKPOL10 e MKPOL11 (802pb): colunas de 1-4 *swabs* cloacais; colunas 5, 7 a 9 bursa de *Fabrícius*; coluna 6 resultado negativo para timo; **B)** Produtos amplificados pelos *primers* TAst_Cap_F/TAst_Cap_R (222bp): coluna 1 amostra positiva de timo; colunas 2 e 3 controle negativo (Vírus da Bronquite Infecciosa [VBI] e água MilliQ ultrapura, respectivamente); **C)** Produtos amplificados pelos *primers* MKPOL10/MKPOL11 (802pb): linhas 5 e 6 baço; colunas 1 a 4 controle negativo (VBI e água MilliQ ultrapura, respectivamente). PM= Marcador de Peso Molecular de 1 Kb plus.

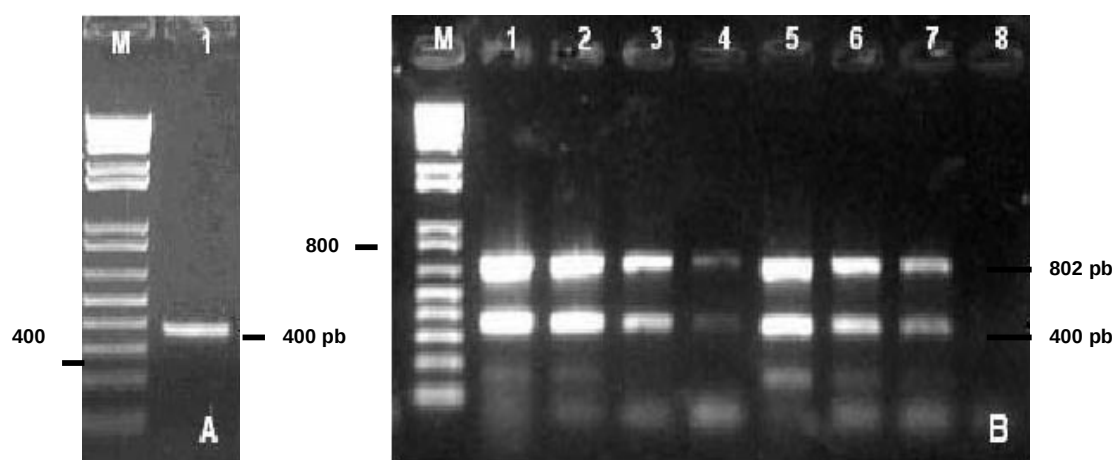


Figura 3 – Produtos da amplificação do gene da beta actina utilizado na presente investigação como gene normalizador (*house keep* ou constitutivo). **A)** Produto amplificado de 400 pb; **B)** Amplificação do gene da beta actina em amostras positivas para os *primers* MKPOL 10 e MKPOL 11 (802pb): colunas 1-4 amostras *swabs* cloacais; colunas 5-7 bursa de *Fabrícus*; coluna 8 controle negativo da reação com água MilliQ ultrapura. PM= Marcador de Peso Molecular de 1 Kb plus.

4.3. Descrição do quadro clínico

Todos os lotes avaliados manifestaram um quadro de enterite aguda descrito pelo corpo técnico da empresa. As aves apresentaram uma não uniformidade no crescimento, com animais de diferentes tamanhos pertencentes ao mesmo lote (Figuras 4A, 4B e 4C), anorexia, apatia, prostração e penas pericloacais sujas de fezes (Figura 4D e 4E), diarreia moderada com fezes de aspecto pastoso e coloração marrom e mortalidade diária em torno de 15% (Figura 4F).

Ao exame macroscópico, após a necropsia, foram observadas atrofia e hemorragia em timos (Figura 5) e bursas de *Fabrácius* (Figura 6), além de enterite severa e distensão da região íleo-cecal devido a gases e líquidos (Figura 7).

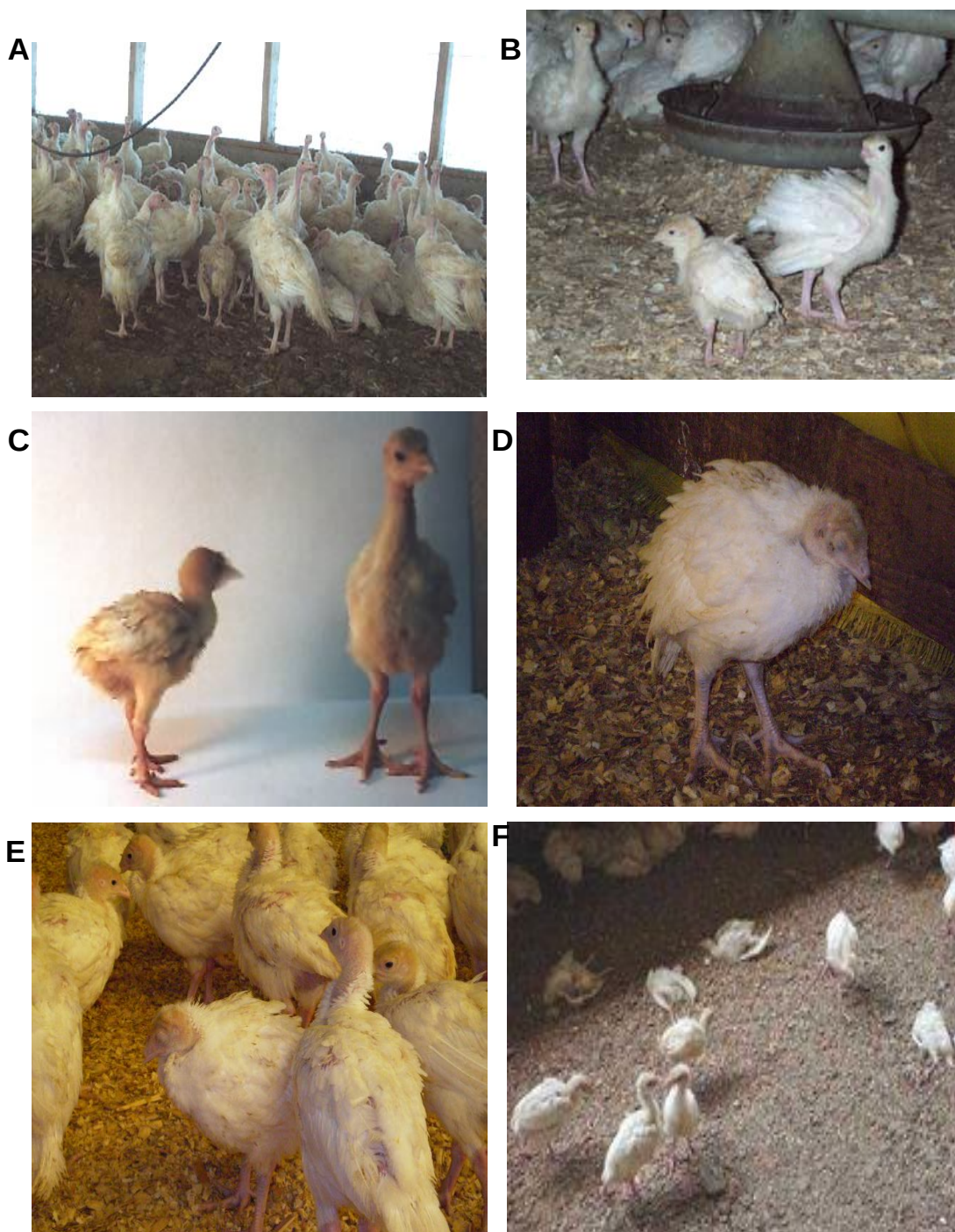


Figura 4 – Aspectos clínico e sanitário dos lotes de perus (*Meleagris gallopavo*) estudados, molecularmente, com diagnóstico positivo para TAsV-2. **A, B e C)** Não uniformidade de crescimento e baixo crescimento; **D e E)** Anorexia, apatia, prostração e penas peri-cloacais sujas de fezes; **F)** Quadro de mortalidade.

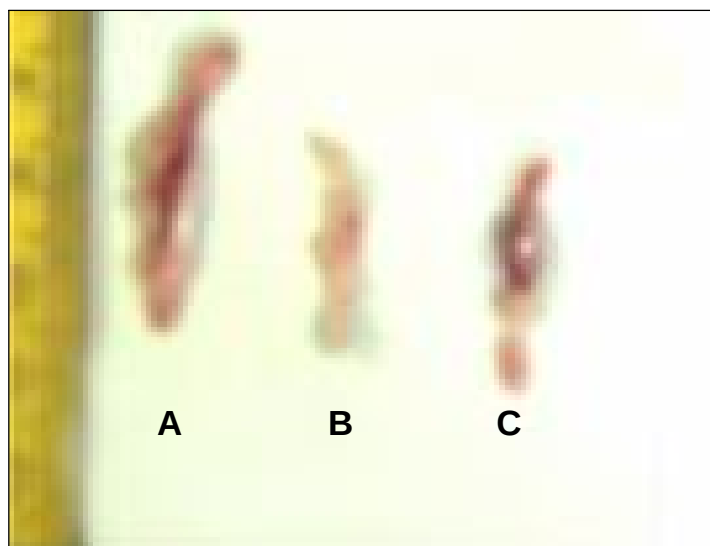


Figura 5 – Exame macroscópico de timos de perus acometidos de enterite, com diagnóstico positivo para TAsV-2 pela RT-PCR. **A)** Timo hemorrágico; **B e C)** Atrofia e hemorragia de timos.

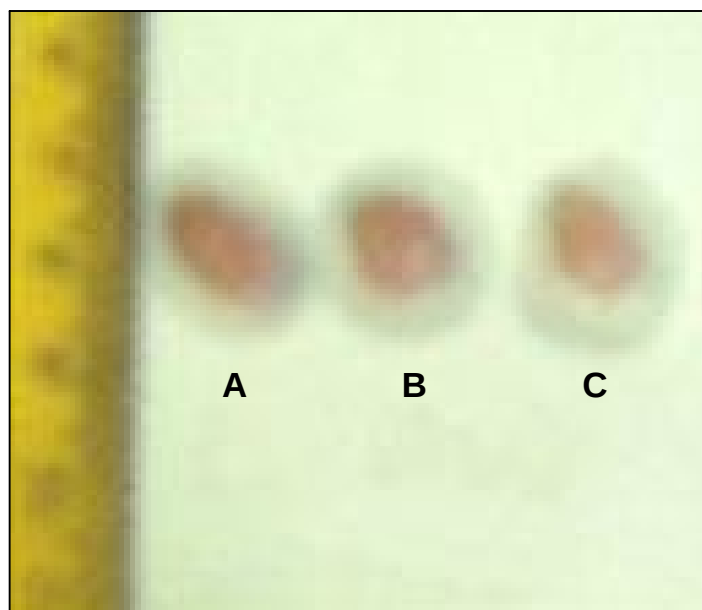


Figura 6 – Exame macroscópico de bursas de *Fabrácius* de perus acometidos de enterite, com diagnóstico positivo para TAsV-2 pela RT-PCR. **A e B)** Bursas de *Fabrácius* hemorrágicas; **C)** Atrofia e hemorragia de bursa.

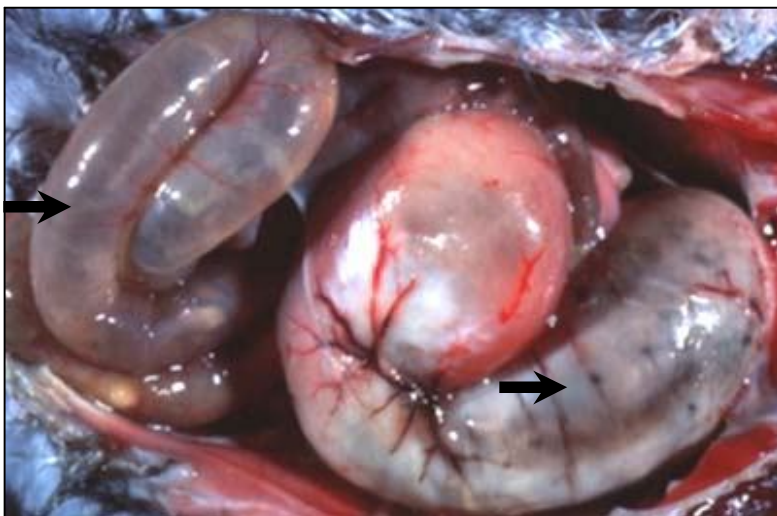


Figura 7 – Enterite severa e distensão de alças intestinais (setas) de perus (*Meleagris gallopavo*) acometidos de diarreia, com diagnóstico positivo para TAstV-2 pela RT-PCR, indicadas pelo exame macroscópico.

5. DISCUSSÃO

Com a aplicação da técnica de RT-PCR foi detectado um *Astrovírus* (AstV) em *swabs* cloacais e em fragmentos histológicos da bursa de *Fabrácius*, timo e baço de perus (*Meleagris gallopavo*) de 30 a 45 dias de idade, provenientes de granjas localizadas na Região do Triângulo Mineiro, no Estado de Minas Gerais. Foram amplificados um fragmento de 802 pb que corresponde ao gene codificador da polimerase viral e outro de 222 pb, que corresponde ao gene codificador de proteína do capsídeo.

Os dois conjuntos de *primers* usados nesse estudo foram desenhados para amplificar regiões específicas do genoma do *Astrovírus* de Perus (TAsTV). O primeiro conjunto, designado MKPOL10 e MKPOL11, é direcionado à ORF1b que contém o gene da polimerase e o segundo, denominado TAsT_Cap_F e TAsT_Cap_R, é direcionado à ORF2, que abriga um gene do capsídeo viral.

Os *primers* MKPOL10 e MKPOL11 amplificaram um produto de 802 pb e confirmaram a presença do gene da polimerase do TAsTV em amostras de *swabs* cloacais e de tecidos linfóides, bursa, timo e baço. Os *primers* utilizados nessa abordagem foram desenhados para amplificar, especificamente, o gene da polimerase do TAsTV (nº de acesso ao *GenBank*: AF206663) porém, não permitiram distinguir os sorotipos dessa espécie, a saber, TAsTV-1 e TAsTV-2. Esses resultados estão em conformidade com os encontrados por Koci *et al.* cujos produtos amplificados confirmaram a presença do TAsTV nos plantéis de perus acometidos de enterite nos EUA (2000b).

A proteína não-estrutural polimerase, altamente conservada, está diretamente envolvida nos processos de transcrição de mRNAs subgenômicos e na replicação do genoma viral, sendo, portanto, uma proteína essencial ao vírus. Assim, é esperado que a identidade do gene que a codifica, em várias espécies de AstV, seja alta e que pouco polimorfismo seja encontrado. Dessa forma, o direcionamento de um método de diagnóstico baseado na detecção desse gene é a abordagem mais lógica para que sejam detectados vírus, sem restrição da espécie viral ou da espécie do hospedeiro em questão (STEPHENSON *et al.*, 1999). Entretanto, ainda que os *primers* MKPOL10 e MKPOL11 sejam direcionados para amplificar regiões altamente conservadas dentro do gene da

polimerase, não é possível, apenas pela positividade de amplificação de produtos por RT-PCR, caracterizar um *Astrovírus*.

Assim sendo, para obtenção de uma caracterização mais precisa do TAstV encontrado, fez-se necessário o seqüenciamento do fragmento obtido e a aplicação da seqüência a métodos de reconstrução filogenética, por alinhamento. O seqüenciamento do DNA complementar (cDNA) obtido por RT-PCR a partir de uma amostra positiva do AstV em perus do Triângulo Mineiro, revelou identidade nucleotídica de 98% do vírus detectado com o TAstV tipo 2 (TAstV-2) isolado na Carolina do Norte (EUA), variante Q/34/1990 (dados não apresentados). Descartada a ocorrência de contaminação entre as amostras clínicas, a análise de seqüenciamento confirmou o TAstV encontrado como sendo geneticamente próximo à variante Q/34/1990. O TAstV detectado tem maior identidade de nucleotídeos com o TAstV-2, na porção do genoma analisada, sendo divergente de outros AstVs isolados em perus comerciais.

Koci *et al.* (2000b) analisaram a especificidade dos *primers* MKPOL10 e MKPOL11 para detecção do TAstV, por RT-PCR. Sob as mesmas condições usadas para o TAstV, empregaram a técnica de RT-PCR para outros vírus de origem entérica como, TCoV (*Coronavírus* dos Perus), AEV (Vírus da Encefalomyelite Aviária), ANV e, ainda, para *Enterovírus* Bovino e o *Parvovírus* de Ganso, a fim de examinar a reação cruzada. Os resultados revelaram os fragmentos específicos de 802 pb apenas em intestinos de embriões SPF ("Specific Pathogen Free") de perus inoculados com TAstV, confirmando que esses *primers* são específicos para detectar a presença do vírus. Esses autores desenvolveram o primeiro protocolo de RT-PCR específica para o TAstV, com o objetivo de demonstrar sua aplicação na detecção direta do patógeno em plantéis comerciais de perus acometidos de doença entérica, tornando-se o primeiro relato do uso da RT-PCR como diagnóstico para infecções por AstV nessa espécie, consolidando a eficácia do teste na pesquisa epidemiológica do vírus.

No presente estudo, a ausência de bandas no controle negativo referente ao Vírus da Bronquite Infecciosa (VBI), juntamente com os dados obtidos na análise de seqüenciamento das amostras positivas, confirmam a especificidade dos MKPOL10 e MKPOL11 na detecção do TAstV em perus do Triângulo Mineiro.

O segundo conjunto de *primers*, Tast_Cap_F e Tast_Cap_R, utilizado nessa pesquisa, direcionado à região ORF2, foi desenhado com base nas seqüências disponíveis do gene codificador das proteínas do capsídeo do TAstV-1 (nº de acesso ao *GenBank*: Y15936) e TAstV-2 (nº de acesso ao *GenBank*: AF206663). Os resultados apontaram a existência de uma banda de 222 pb em amostras de timo e baço de perus, consideradas negativas pelos *primers* MKPOL10 e MKPOL11. De acordo com Catolli *et al.* (2006), esses oligonucleotídeos foram desenhados para amplificarem, especificamente, um segmento de 236 pb para TAstV-1 e outro de 222 pb para TAstV-2.

Considerando os resultados de seqüenciamento e com base nos comprimentos dos fragmentos amplificados pelos *primers* Tast_Cap_F e Tast_Cap_R, pode-se concluir que o TAstV detectado aqui é do tipo 2 (TAstV-2), pois amplificações de 236 pb para TAstV-1 não foram obtidas e as de 222 pb observadas são específicas para TAstV-2.

Segundo Poch *et al.* (1989), inúmeras pressões imunes sobre o gene do capsídeo resultam em múltiplos sorotipos virais. Por isso, *primers* direcionados ao gene da polimerase foram, também, usados nesse estudo por se tratar de um gene mais conservado do que o capsídeo.

O gene da polimerase é conservado entre os vírus RNA de uma mesma família e por isso, é usado para o desenho de *primers* para detecção de membros pertencentes à mesma família; em contrapartida, o gene do capsídeo possui variabilidade que impossibilita o desenho de *primers* para diferentes cepas de *Astrovírus*. Tang *et al.* (2005b), através de análise de similaridade nucleotídica entre TAstV-1 e TAstV-2 (nºs de acesso ao *GenBank*: Y15936 e AF206663, respectivamente) revelaram que o gene da polimerase de ambos os sorotipos não apresentaram nenhuma região conservada. A aplicação de *primers* desenvolvidos a partir de um único sorotipo de TAstV pode limitar o espectro de detecção da RT-PCR. No presente estudo, com a utilização dos *primers* direcionados à região ORF2 (Tast_Cap_F e Tast_Cap_R) oriundos de dois sorotipos distintos foi possível melhorar o espectro de detecção por RT-PCR, conforme já observado por Tang *et al.* (2005b). O espectro de detecção por RT-PCR pode ser restrito quando se utiliza *primers* baseados em seqüências de um único sorotipo, como realizado por Koci *et al.* (2000b) cuja RT-PCR detectou a

presença de TAsTV nas aves doentes, baseando-se em um sorotipo (nº de acesso ao *GenBank*: AF206663) porém, sem distinguir a espécie encontrada.

Com base na taxa de positividade de 100% das amostras de *swabs* cloacais para o TAsTV-2, pode-se inferir que esse tipo de amostra é um alvo adequado para se rastrear o vírus, além das vantagens de manipulação do material clínico. Os *swabs* são fáceis de executar e podem ser analisados em *pool* de aves, além de serem processados com mais facilidade em comparação às amostras teciduais; economizam tempo e custos e eliminam a necessidade de eutanásia de aves para amostragem. Spackman *et al.* (2005) demonstraram uma correlação positiva entre amostras de *swabs* cloacais e de suspensões de intestinos na detecção da presença do TAsTV-2 em perus e confirmaram que o uso do *swab* na técnica de RT-PCR permite adequada detecção viral em rebanhos infectados.

Uma RT-PCR dirigida ao gene N (gene codificador das proteínas do nucleocapsídeo) do TCoV foi realizada com sucesso na detecção do vírus a partir de amostras de *swabs* cloacais, fezes, suspensões teciduais de intestinos, com seus respectivos conteúdos e suspensão tecidual de bursa de perus com quadro clínico de PEMS. No entanto, os resultados revelaram que, para esse gene, amostras de fezes e suspensões intestinais apresentaram maior espectro de detecção do que os *swabs* cloacais (TEIXEIRA *et al.*, 2007). Uma provável explicação para isso é a alta umidade e temperatura, comumente, encontrados nos locais de surtos e que podem aumentar a chance de crescimento de bactérias e fungos nos *swabs*, e assim, degradar o RNA viral (CAVANAGH *et al.*, 1997).

Nesse estudo, a presença do TAsTV-2 foi demonstrada, também, em locais independentes de tecido ou conteúdo gastrintestinal (*swabs* cloacais), ou seja, em suspensões teciduais originárias de bursa de *Fabricíus*, timo e baço. Pelo emprego da RT-PCR foi possível amplificar fragmentos específicos do TAsTV-2 nos tecidos linfóides analisados. Os resultados aqui observados corroboram relatos anteriores de que tecidos extra-intestinais deterioram-se ao reproduzir a PEMS, associada ao TAsTV-2 (KOCI *et al.*, 2000a).

Schultz-Cherry *et al.* (2000) observaram que perus *naïve* (sem a doença) inoculados, via oral, com suspensões tímicas oriundas de aves acometidas de

PEMS, reproduziram além dos sinais clássicos da moléstia como, enterite, problemas de uniformidade e alta mortalidade, a ocorrência de atrofia linfóide e imunossupressão e concluíram que o timo de aves infectadas é fonte do(s) agente(s) que reproduz(em) a PEMS. Além disso, demonstraram, por histopatologia, que o timo exibe sinais mais precoces da patologia. Posteriormente, o patógeno relacionado à PEMS, descrito por Schultz-Cherry *et al.* (2000), foi isolado em timo, caracterizado e identificado como TAsTV-2, sendo associado a uma doença emergente, a PEMS, assim considerada por causar severa enterite, elevados índices de mortalidade e imunossupressão (KOCI *et al.*, 2000a). Embora, em outros estudos, o TAsTV-2 já tenha sido detectado por RT-PCR a partir de suspensões teciduais de timo e bursa de perus acometidos de enterite, o presente trabalho é a primeira descrição de detecção do vírus pela RT-PCR a partir de amostras de baço.

A função do baço nas aves ainda não é completamente entendida, mas tem um papel de maior importância na imunidade sistêmica nesses animais do que o baço dos mamíferos. Isso se deve, principalmente, ao fato da maioria das aves não apresentar vasos e gânglios linfáticos e, por isso, grande proporção do tecido esplênico é direcionado somente para defesa (TOIVANEN e TOIVANEN, 1987). Portanto, deve-se considerar que após a involução dos órgãos linfóides primários nas primeiras semanas de vida, o baço é órgão linfóide mais importante para a imunidade das aves. Dessa forma, em decorrência dos danos no baço provocados pelo vírus, as aves poderão não responder com a produção de anticorpos a desafios por agentes infecciosos ou às vacinas.

O RNA proveniente de amostras clínicas de fezes e/ou de tecidos em processos inflamatórios pode diminuir a sensibilidade da RT-PCR por causar resultados falso-negativos (TANG *et al.*, 2005a; TANG *et al.*, 2005b; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Um controle interno (CI) da RT-PCR, composto por *primers* degenerados não-competitivos (*non-target*) (Beta *actin* F e Beta *actin* R – nº de acesso ao *GenBank*: X00182) acompanhou a reação de RT-PCR do presente estudo, para monitorar e minimizar possíveis falhas causadas por inflamações teciduais oriundas da patogênese viral e, então, eliminar resultados falso-negativos. A aplicação do CI aumentou o espectro de detecção e comprovou a eficácia da RT-PCR. No presente estudo, a RT-PCR utilizando CI como

normalizador, mostrou alta sensibilidade e especificidade, proporcionando alta consistência na detecção de ácidos nucleicos do TAsTV-2 nas amostras clínicas analisadas.

Tang *et al.* (2005b) analisaram, comparativamente, o efeito do CI na RT-PCR monoplex e multiplex e demonstraram que a reação multiplex possui especificidade e sensibilidade superiores à monoplex, porém com o CI, a reação monoplex foi capaz de superar falhas de sensibilidade e ampliar o espectro de detecção. Apesar das limitações, a RT-PCR monoplex mostrou superioridade sobre a clássica prova de ME, confirmando-se como uma técnica adequada para identificação de sorotipos virais e útil para a detecção de novos TAsTVs.

Dentre outras vantagens, os *primers* de CI evitam a interferência entre dois conjuntos de *primers* em uma reação multiplex e os produtos da sequência alvo e do CI são facilmente distinguíveis por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) (HOOFFAR *et al.*, 2004).

Apesar de outras modalidades de RT-PCRs, como a RT-PCR em tempo real e a multiplex, serem descritas como mais rápidas e com melhor sensibilidade e especificidade em relação à monoplex semiquantitativa (TANG *et al.*, 2005a; TANG *et al.*, 2005b), nossos resultados obtidos com CI demonstraram que o TAsTV-2 de campo foi detectado com rapidez, em diferentes amostras clínicas, além de evidenciarem boa sensibilidade e especificidade.

Durante o período de coleta das amostras clínicas, as aves apresentaram sintomatologia clínica sugestiva de PEMS, com presença dos sintomas de diarreia, anorexia, prostração, baixo crescimento, não uniformidade e alta mortalidade. O exame macroscópico dos órgãos revelou atrofia e hiperemia de bursa de *Fabricius* e timo, severa enterite, com ração mal digerida na luz intestinal, além de alta distensão da região íleo-cecal devido aos gases e líquidos. Essas mesmas características foram observadas nos plantéis infectados pelo TAsTV-2 no Estado da Carolina do Norte, Estados Unidos (BARNES e GUY, 1997; BARNES *et al.*, 1996; BEHLING-KELLY *et al.*, 2002).

As lesões histopatológicas observadas nos tecidos linfóides analisados apresentaram concordância com a presença do vírus nesses tecidos, conforme indicado pela RT-PCR. As lesões microscópicas nas bursas como, por exemplo, destruição leve a moderada dos folículos linfóides, rarefação linfocitária,

especialmente em região medular, atrofia e necrose são concordantes com o tropismo pelos órgãos linfóides e a patogenia do TAstV-2 (QURESHI *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2006).

Tang *et al.* (2006) analisaram, comparativamente, os efeitos causados por dois isolados diferentes de TAstV (TAstV1987 e TAstV2001) sobre órgãos linfóides de embriões de perus SPF e perus convencionais, experimentalmente infectados. Os resultados revelaram diferença de patogenicidade, pois, apesar de lesões macroscópicas em timo e bursa não terem sido relacionadas à patogênese de nenhum dos isolados, apenas o TAstV1987 induziu lesões microscópicas em bursa de *Fabrácius*, mas não em timo, sugerindo, apesar da ausência de lesões tímicas, que essa cepa seja responsável por danos no sistema imune dos hospedeiros. No entanto, ambas as cepas foram capazes de causar enterite com lesões intestinais macroscópicas similares, sendo, portanto, considerados agentes etiológicos de enterite em perus.

O tropismo e as lesões histológicas na bursa de *Fabrácius*, relacionados ao TAstV1987, foram coerentes com os resultados observados no presente estudo. Tang *et al.* (2006) observaram além de rarefação linfocitária no tecido bursal, aumento do estroma folicular. Com relação à análise dos timos, os resultados aqui observados divergem dos apresentados por Tang *et al.* (2006), uma vez que, sinais de depleção celular e necrose na região medular do timo estiveram associados à detecção do TAstV-2, nos lotes do Triângulo Mineiro e nenhuma alteração na arquitetura tímica foi observada na infecção pelo TAstV1987. Pode-se, então, sugerir que o vírus identificado no presente estudo seja mais virulento que o TAstV1987 e, ainda, é possível que esteja associado a um quadro de imunossupressão mais severo. Essas observações podem indicar que há diferenças de patogenicidade entre as cepas isoladas nos EUA e a encontrada no Triângulo Mineiro.

Diferença a nível molecular entre TAstV1987 e TAstV2001 foi, também, descrita, onde a identidade nucleotídica com o TAstV-2 (nº de acesso ao *GenBank*: AF206663) foi de 96,9% e 82,3% para TAstV1987 e TAstV2001, respectivamente, indicando que o TAstV1987 é geneticamente mais relacionado ao TAstV-2 do que o TAstV2001. Além disso, diferenças morfológicas foram reveladas, em que a aparência de estrela foi mais evidente no TAstV1987 do que

no TAsTV2001. Análise das proteínas do capsídeo por SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida) indicaram que os capsídeos dos dois isolados apresentam proteínas diferentes (TANG *et al.*, 2006).

De acordo com Tang *et al.* (2005c), diferenças de patogenicidade sugerem mudanças genômicas, provavelmente, relacionadas a mutações e recombinações no vírus provocadas pela polimerase viral. Segundo Matsui e Greenberg (2001), a polimerase é uma enzima propensa a erro e a taxa de divergência para esse tipo de enzima é estimada em 0,03% a 2,0% por nucleotídeo/ano. Assim, é razoável sugerir que o TAsTV1987 e TAsTV2001 tenham sido alvos de mutações genômicas que podem, também, estar relacionadas à patogenicidade diferente apresentada pelo vírus detectado em Minas Gerais.

O fato dos HAsTV-3 e HAsTV-7 compartilharem identidade de seqüências de aminoácidos de 84,3% para a região do capsídeo e, ainda, serem classificados como sorotipos diferentes, levaram Tang *et al.* (2005c) à hipótese de que os isolados TAsTV1987 e TAsTV2001, cuja identidade para a mesma região é de 82,8%, pertençam a sorotipos diferentes.

A bursa *Fabrícius* é um órgão linfóide exclusivo de aves, localizado na face superior da cloaca, com a qual se comunica (BAUMEL, 1993). Este órgão é indispensável ao desenvolvimento e funcionamento do tecido linfóide periférico e à competência para manutenção da imunidade humoral constituída por células B (GLICK, 1960), pois, juntamente com o timo, promove a maturação e a transferência de linfócitos para outros tecidos dependentes tais como, o baço, glândula lacrimal da terceira pálpebra e nódulos linfáticos agregados ao canal alimentar (SILVA *et al.*, 2003).

Alterações histopatológicas em bursa e timo são capazes de comprometer a resposta imunológica das aves e favorecer infecções secundárias (TANG *et al.*, 2006; MARIN *et al.*, 2003). Yu *et al.* (2000) detectaram um SRV, posteriormente reconhecido como TAsTV, relacionado à enterite e hemorragia de timo em perus acometidos por quadro severo de imunossupressão e elevada mortalidade, provavelmente, acompanhado de infecções por outros patógenos “oportunistas”.

Qureshi *et al.* (2000) demonstraram a translocação do TAsTV-2 do trato gastrointestinal aos órgãos linfóides, em que perus SPF e convencionais inoculados, via oral, evidenciaram a presença do antígeno viral em tecidos

intestinais 2 a 4 dias pós-inoculação, enquanto tecidos linfóides como, bursa, timo e baço, apresentaram-se positivos ao antígeno a partir de 4 a 8 dias pós-inoculação. Além disso, a infecção pelo TAsTV-2 comprometeu a defesa imune mediada por linfócitos, por reduzir a linfoproliferação e os linfócitos CD4- e CD8+ (presumivelmente células T-citotóxicas) no estágio agudo da infecção. As aves, experimentalmente infectadas pelo TAsTV-2, reproduziram sintomatologia clínica típica da PEMS no campo e semelhante à apresentada pelas aves do presente estudo.

Yu *et al.* (2000) mostraram que a combinação de TAsTV-2 e TCoV em protocolos experimentais resultaram em surtos com mortalidade elevada, comparados a dados individuais com os mesmos patógenos, sugerindo que a severidade dos sinais clínicos e da mortalidade pode estar relacionada com os agentes envolvidos e com a ocorrência de co-infecções.

Teixeira *et al.* (2007), através da RT-PCR, histopatologia e imunohistoquímica, relataram a presença de TCoV em rebanhos comerciais de perus, provenientes de granjas do Triângulo Mineiro, acometidos de severa diarreia, mortalidade e não uniformidade do crescimento. De acordo com os nossos resultados, é possível que TAsTV-2 e TCoV estejam co-circulando nos plantéis em Minas Gerais, causando um impacto sinérgico negativo sobre a saúde das aves com, conseqüente, potencialização dos sinais clínicos PEMS-like.

Os AstVs são conhecidos, principalmente, por causar gastroenterite aguda em humanos e animais jovens. Os HAsTVs são bem caracterizados antigênica e geneticamente, no entanto, informações sobre TAsTV ainda são limitadas. A aplicação de testes de diagnóstico como, RT-PCR e análises de seqüenciamento, pode fornecer bases moleculares para diferenças antigênicas entre espécies de TAsTV, isoladas no campo e, conseqüentemente, contribuir para a formulação de estratégias para prevenção e controle de doenças causadas por esses vírus. Além disso, a definição das características das proteínas do capsídeo, altamente variáveis, pode esclarecer sobre a disseminação e a evolução dos TAsTVs.

De acordo com os resultados aqui apresentados, todos os swabs cloacais analisados foram positivos para TAsTV-2, sugerindo disseminação viral, com

intensa diarreia e mudanças significantes detectadas nos órgãos do sistema imune.

Até o momento, com base na literatura nacional e internacional, a alta homologia observada entre o vírus encontrado em Minas Gerais e o isolado na Carolina do Norte, em relação à região ORF1b, sugere o primeiro relato de TAsTV-2 circulante em plantéis comerciais de perus na América Latina. Outros estudos são necessários para elucidar a possibilidade de vários genótipos do TAsTV circulantes entre aves comerciais e selvagens e, ainda, para entender a epidemiologia viral nessas espécies.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos, analisados e discutidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- Pela RT-PCR dirigida aos genes codificadores da polimerase e das proteínas do capsídeo, foi possível detectar um TAsTV do Tipo 2 (TAsTV-2) em amostras de *swabs* cloacais, bursa de *Fabrácius*, timo e baço de perus (*Meleagris gallopavo*) de 30 a 45 dias de idade, com sintomas de diarreia, baixo crescimento e alta taxa de mortalidade, da Região do Triângulo Mineiro.
- A técnica de RT-PCR se configurou como uma metodologia eficaz na detecção do vírus de campo e, ainda, mostrou boa sensibilidade e especificidade, além de praticidade na execução.
- À histopatologia, perus de 30 a 45 dias, com quadro clínico de enterite, apresentaram lesões em órgãos linfóides primários, bursa de *Fabrácius* e timo, bem como o baço, confirmando o tropismo do TAsTV-2 pelo o sistema imune de perus com enterite aguda.
- Os sinais clínicos, detecção viral e lesões histopatológicas observadas, foram compatíveis com as descrições para a infecção por TAsTV-2, segundo a literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AROONPRASERT, D.; FAGERLAND, J. A.; KELSO, N. E.; ZHENG, S.; WOODE, G. N. Cultivation and partial characterization of bovine astrovirus. **Veterinary Microbiology**, v. 19; p. 113-125, 1989.

BARNES, H. J.; GUY, J. S.; BROWN, T. P.; EDENS, F. W. Poult enteritis mortality syndrome ("spiking mortality of turkeys") and related disorders – an update and overview. **Newsletter**, College of Veterinary Medicine and College of Agriculture and Life Sciences, NCSU, Oct. 29, p. 1-11, 1996.

BARNES, H. J. Viral enteric infections. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 685-686.

BARNES, H. J.; GUY, J. S. Poultry enteritis mortality syndrome ("spiking mortality") of turkeys. In: CALNEK, B. W.; BARNES, H. J.; BEARD, C. W.; MCDOUGALD, L. R.; SAIF, Y. M. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1997. p. 1025-1031.

BARNES, H. J.; GUY, J. S. Clinicopathologic findings in turkeys with severe form of poult enteritis mortality syndrome. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 215, p. 1675, 1999.

BARNES, H. J.; GUY, J. S. Poult enteritis mortality syndrome. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.320-326.

BASS, D. M.; UPADHYAYULA, U. Characterization of human serotype 1 astrovirus-neutralizing epitopes. **Journal of Virology**, v. 71, p. 8666-8671, 1997.

BASS, D. M.; QIU, S. Proteolytic processing of the astrovirus capsid. **Journal of Virology**, v. 74, p. 1810-1814, 2000.

BAUMEL, J. J. **Handbook of avian anatomy: Nomina Anatomica Avium**. 2. ed. Cambridge: Nuttall Ornithological Club, 1993. p. 779.

BEHLING-KELLY, E.; SCHULTZ-CHERRY, S. L.; KOCI, M. D.; KELLEY, L. A.; LARSEN, D.; BROWN, C. Localization of astrovirus in experimentally infected turkeys as determined by in situ hybridization. **Veterinary Pathology**, v. 39, p. 595-598, 2002.

BELLIOT, G.; LAVERAN, H.; MONROE, S. S. Detection and genetic differentiation of human astroviruses: phylogenetic grouping varies by coding region. **Archives of Virology**, v. 142, p. 1323-1334, 1997.

CATTOLI, G.; TOFFAN, A.; DE BATTISTI, C.; SALVIATO, A.; TERREGINO, C.; CAPUA, I. Astroviruses found in the intestinal contents of guinea fowl suffering from enteritis. **Veterinary Record**, v. 12, p. 220, 2005.

CATTOLI, G.; DE BATTISTI, C.; TOFFAN, A.; SALVIATO, A.; LAVAZZA, A.; CERIOLI, M.; CÁPUA, I. Co-circulation of distinct genetic lineages of astroviruses in turkeys and guinea fowl. **Archives of Virology**, v. 152, p. 595-602, 2006.

CAUL, E. O.; APPLETON, H. The electron microscopical and physical characteristics of small round human fecal viruses: an interim scheme for classification. **Journal of Medical Virology**, v. 9, p. 257-265, 1982.

CAVANAGH, D. Recent advances in avian virology. **British Veterinary Journal**, v. 148, p. 199-222, 1992.

CAVANAGH, D.; MAWDITT, K.; SHARMA, M.; DRURY, S. E.; AINSWORTH, H. L.; BRITTON, P.; COUGH, R. E. Detection of a coronavirus from turkeys poult in

Europe genetically related to infectious bronchitis virus of turkeys. **Avian Pathology**, v. 30, p. 365-378, 2001.

CULVER, F.; DZIVA, F.; CAVANAGH, D.; STEVENS, M. P. Poult enteritis and mortality syndrome in turkeys in Great Britain. **The Veterinary Record**, v. 159, n. 7, p. 209-210, 2006.

EDENS, F. W.; DOERFLER, R. E. Controlling poult enteritis and mortality syndrome. **World Poultry**, v. 13, p. 48-50, 1999.

GIBSON, C. A.; CHEN, J. MONROE, S. A.; DENISON, M. R. Expression and processing of nonstructural proteins of the human astroviruses. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 440, p. 387-391, 1998.

GLICK, B. Growth of the bursa of Fabricius and its relationship to the adrenal gland in White Pekin Duck, White Leghorn, outbred and inbred New Hampshire. **Poultry Science**, v. 39, p. 30-139, 1960.

GORBALENYA, A. E.; DONCHENKO, A. P.; BLINOV, V. M.; KOONIN, E. V. Cysteine proteases of positive strand RNA viruses and chymotrypsin-like serine proteases. A distinct protein superfamily with a common structural fold. **FEBS Letters**, v. 243, p. 103-114, 1989.

GUY, J. S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. **Poultry Science**, v. 77, n. 8, p. 1166-1175, 1998.

GUY, J. S. Turkey coronavirus enteritis. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; MCDOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 2003. p.300-307.

HOOFFAR, L.; MALORNY, B.; ABDULMWJOOD, A.; COOK, N.; WAGNER, M.; FACH, P. Practical consideration in design of internal amplification controls for

diagnostic PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 5, p. 1863-1868, 2004.

IMADA, T. S.; YAMAGUCHI, S.; MASE, M.; TSUKAMOTO, K.; KUBO, M.; MOROOKA, A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. **Journal of Virology**, v. 74, p. 8487-8493, 2000.

ISMAIL, M. M.; TANG, Y.; SAIF, Y. M. Pathogenicity of turkey coronavirus in turkeys and chickens. **Avian Diseases**, v. 47, p. 515-522, 2003.

JACOBSON, R. H. **Principles of Validation of Diagnostic Assays for Infectious Diseases**. France: Organização Internacional de Epizootias, 1996. p. 8-15.

JONASSEN, C. M.; JONASSEN, T. O.; GRINDE, B. A common RNA motif in the 3' end of the genomes of astroviruses, avian infectious bronchitis virus and an equine rhinovirus. **Journal of General Virology**, v. 79, p. 715-718, 1998.

JONASSEN, C. M.; JONASSEN, T. O.; SAIF, Y. M.; SNODGRASS, D. R.; USHIJIMA, H.; SHIMIZU, M.; GRINDE, B. Comparison of capsid sequences from human and animal astroviruses. **Journal of General Virology**, v. 82, p. 1061-1067, 2001.

JONASSEN, C. M.; JONASSEN, T. O.; SVEEN, T. M.; GRINDE, B. Complete genomic sequence of astrovirus from sheep and turkey: comparison with related viruses. **Virus Research**, v. 91, p. 195-201, 2003.

KOCI, M. D.; SEAL, B. S.; SCHULTZ-CHERRY, S. Molecular characterization of an avian astrovirus. **Journal of Virology**, v. 74, p. 6173-6177, 2000a.

KOCI, M. D.; SEAL, B. S.; SHULTZ-CHERRY, S. Development of an RT-PCR diagnostic test for an avian astrovirus. **Journal of Virological Methods**, v. 90, p. 79-83, 2000b.

KOCI, M. D.; SCHULTZ-CHERRY, S. Avian astroviruses. **Avian Pathology**, v. 31, p. 213-227, 2002.

KOCI, M. D.; MOSER, L. A.; KELLEY, L. A.; LARSEN, D.; BROWN, C. C.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. **Journal of Virology**, v. 77, n. 21, p. 11798-11808, 2003.

KURTZ, J. B.; LEE, T. W.; PARSONS, A. J. The action of alcohols on rotavirus, astrovirus, and enterovirus. **Journal of Hospital Infection**, v. 1, p. 321-325, 1980.

LUKASHOV, V. V.; GOUDSMIT, J. Evolutionary relationships among *Astroviridae*. **Journal of General Virology**, v. 83, p. 1397-1405, 2002.

MADELEY, C. R.; COSGROVE, B. P. Viruses in infantile gastroenteritis. **Lancet**, v. 2, p. 124, 1975.

MADELEY, D. Viruses and diarrhea – Where are we now? **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 101, p. 497-504, 1993.

MARIN, F. P.; RIVERA, S.; FINOL, G.; MÁVAREZ, Y. Aflatoxin B1, Selenium e *Sacharomyces cerevisiae* in the immune response of broiler chickens in Zulia State, Venezuela. **Revista Científica**, v. 8, n. 5, p. 360-370, 2003.

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B. Astroviruses. In: FIELDS, D., M.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1996. p. 811-824.

MATSUI, S. M.; GREENBERG, H. B. Astroviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia: Lippincott-Williams & Wilkins, 2001. p. 875-893.

MCNULTY, M. S.; CURRAN, W. L.; MCFERRAN, J. B. Detection of astroviruses in turkey faeces by direct electron microscopy. **Veterinary Record**, v. 106, p. 561, 1980.

MÉNDEZ, E.; FERNÁNDEZ-LUNA, T.; LÓPEZ, S.; MÉNDEZ-TOSS, M.; ARIAS, C. F. Proteolytic processing of a serotype 8 human astrovirus ORF2 polyprotein. **Journal of Virology**, v. 76, p. 7996-8002, 2002.

MÉNDEZ, E.; SALAS-OCAMPO, M. P. E.; MUNGUÍA, M. E.; ARIAS, C. F. Protein products of the open reading frames encoding nonstructural proteins of human astrovirus serotype 8. **Journal of Virology**, v. 77, p. 11378-11384, 2003.

NICHOLAS, R. A.; GODDARD, R. D.; LUFF, P. R. Prevalence of avian nephritis virus in England. **Veterinary Record**, v. 123, p. 398, 1988.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; WOOLCOCK, P. R. Molecular characterization and typing of chicken and turkey astroviruses circulating in the United States: Implications for diagnostics. **Avian Diseases**, v. 50, p. 397-404, 2006a.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; SPACKMAN, E.; WOOLCOCK, P. R. Phylogenetic analysis of turkey astroviruses reveals evidence of recombination. **Virus Genes**, v. 32, p.187-192, 2006b.

PASCUCCI, S.; LAVAZZA, A. A survey of enteric viruses in commercial avian species: experimental study of transmissible enteritis of guinea fowl. In: MCNULTY, M.S.; MCFERRAN, J. B. (Ed.). **New and evolving virus diseases of poultry**. Comission of the European Communities, Brussels, Belgium, 1994. p. 225-241.

POCH, O.; SAUVAGET, I.; DELARUE, M.; TORDO, M. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. **The EMBO Journal**, v. 8, p. 3867-3874, 1989.

PORTER, R. E. Bacterial enteritis of poultry. **Poultry Science**, v. 77, n. 8, p. 1159-1165, 1998.

QURESHI, M. A.; YU, M.; SAIF, Y. M. A novel "small round virus" inducing poult enteritis and mortality syndrome and associated immune alterations. **Avian Diseases**, v. 4, p. 275-283, 2000.

REYNOLDS, D. L.; SAIF, Y. M. Astrovirus: a cause of an enteric disease in turkey poults. **Avian Diseases**, v. 30, p. 728-735, 1986.

REYNOLDS, D. L.; SAIF, Y. M.; THEIL, K. W. A survey of enteric viruses of turkey poults. **Avian Diseases**, v. 31, p. 89-98, 1987a.

REYNOLDS, D. L.; SAIF, Y. M.; THEIL, K. W. Enteric viral infections of turkey poults: incidence of infection. **Avian Diseases**, v. 31, p. 272-276, 1987b.

REYNOLDS, D. L. Astrovirus infections. In: CALNEK, B. W. (9^a Ed.). **Diseases of Poultry**. Ames: Iowa State University Press, 1991. p. 635-638.

REYNOLDS, D. L.; SCHULTZ-CHERRY, S. L. Astrovirus Infections. In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FLADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Ed.). **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, 2003. p. 320-326.

RISCO, C.; CARRASCOSA, J. L.; PEDREGOSA, A. M.; HUMPHREY, C. D.; SÁNCHEZ-FAUCHIER, A. Ultrastructure of human astrovirus serotype 2. **Journal of General Virology**, v. 76, p. 2075-2080, 1995.

SAIF, L. J.; SAIF, Y. M.; THEIL, K. W. Enteric viruses in diarrheic turkey poults. **Avian Diseases**, v. 29, p. 798-811, 1985.

SCHNEIDER, W. L.; ROOSSINK, M. J. Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. **Journal of Virology**, v. 75, p. 6566-6571, 2001.

SCHULTZ-CHERRY, S. L.; KAPCZYNSKI, D.;R.; SIMMONS, V.;M.; KOCI, M. D.; BROWN, C.; BARNES, H. J. Identifying agent(s) associated with poult enteritis mortality syndrome: importance of the thymus. **Avian Diseases**, v. 44, n. 2, p. 256-265, 2000.

SCHULTZ-CHERRY, S. L.; KING, D. J.; KOCI, M. D. Inactivation of an astrovirus associated with poult enteritis mortality syndrome. **Avian Diseases**, v. 45, p. 76-82, 2001.

SELLERS, H. S.; LINNEMANN, E. G.; PEREIRA, L.; KAPCZYNSKI. Philogenetic analisys of the sigma 2 protein gene of turkeys reoviruses. **Avian Diseases**, v. 48, p. 651-657, 2004.

SILVA, F. O. C.; SEVERINO, R. S.; DRUMMOND, S. S.; MACHADO, G. V.; BOMBONATO, P. P.; SANTANA, M. I.; LIMA, E. M. M. Suprimento arterial para bolsa cloacal de galinhas (*Gallus gallus* Linnaeus, 1758) da linhagem Label Rouge. **Archives of Veterinary Science**, v. 8, n. 1, p. 13-18, 2003.

SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D.; SELLERS, H. Multiplex real-time reverse transcription-polimerase chain reaction for the detection of three viruses associated with poult enteritis complex: turkey astrovirus, turkey coronavirus and turkey reovirus. **Avian Diseases**, v. 49, p. 86-81, 2005.

STEPHENSEN, C. B.; CASEBOLT, D. B.; GANGOPADHYAY, N. N. Phylogenetic analisys of a highly conserved region of the polymerase gene from 11 coronaviruses and development of a consensus polymerase chain reaction assay. *Virus Research*, v. 60, p. 181-189, 1999.

TANG, Y.; ISMAIL, M. M.; SAIF, Y. M. Development of a ssRNA internal control template reagent for a multiplex RT-PCR to detect turkey astroviruses. **Journal of Virological Methods**, v. 126, p. 81-86, 2005a.

TANG, Y.; ISMAIL, M. M.; SAIF, Y. M. Development of antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay and RT-PCR for detection of turkey astroviruses. **Avian Diseases**, v. 49, p. 182-188, 2005b.

TANG, Y.; MURGIA, M. V.; SAIF, Y. M. Molecular characterization of the capsid gene of two serotypes of turkeys astroviruses. **Avian Diseases**, v. 49, p. 514-519, 2005c.

TANG, Y.; MURGIA, M. V.; WARD, L.; SAIF, Y. M. Pathogenicity of turkey astroviruses in turkey embryos and poult. **Avian Diseases**, v. 50, p. 526-531, 2006.

TEIXEIRA, M. C. B.; LUVIZOTTO, M. C. R.; FERRARI, H. F.; MENDES, A. R.; SILVA, S. E. L.; CARDOSO, T. C. Detection of turkey coronavirus in commercial turkey poult in Brazil. **Avian Pathology**, v. 36, n. 1, p. 29-33, 2007.

TOIVANEN, A.; TOIVANEN, P. Stem cells of the lymphoid system. In: TOIVANEN, A.; TOIVANEN, P. (Ed.). *Avian Immunology: Basis and Practice*. Boca Raton: CRC Press, 1987, v.1, ??? p.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA: **Relatório anual 2006–2007**. Disponível em: <http://www.uba.org.br/ubaneuws_files/relatorio_uba_06_07_baixa_1.pdf>. Acesso em: 05 out. 2007.

WALTER, J. E.; MICHELL, D. K. Astrovirus infection in children. **Current Opinion Infectious Diseases**, v. 16, p. 247-253, 2003.

WANG, Q. H.; KAKIZAWA, L.; WEN, L. Y.; SHIMIZU, M.; NISHIO, O.; FANG, Z. Y.; USHIJIMA, H. Genetic analysis of the capsid region of astroviruses. **Journal of Medical Virology**, v. 64, p. 245-255, 2001.

WILLCOCKS, M. M.; BROWN, T. D.; MADELEY, C. R.; CARTER, M. J. The complete sequence of a human astrovirus. **Journal of General Virology**, v. 75, p. 1785-1788, 1994.

WILLCOCKS, M. M.; BOXALL, A. S.; CARTER, M. J. Processing and intracellular location of human astrovirus non-structural proteins. **Journal of General Virology**, v. 80, p. 2607-2611, 1999.

YU, M.; TANG, Y.; GUO, M.; ZHANG, Q.; SAIF, Y. M. Characterization of a small round virus associated with the poult enteritis and mortality syndrome. **Avian Diseases**, v. 44, p. 600-610, 2000.

8. ANEXOS

Anexo I – Trabalho aceito para publicação no JVMS (Journal of Veterinary Medical Science)

NOTE *Avian Pathology*

Detection of Turkey Astrovirus in Young Poults Affected with Poult Enteritis Complex in Brazil

Sérgio E. L. DA SILVA¹⁾, Ana M. BONETTI¹⁾, Adriana T. M. PETROCELLI¹⁾, Heitor F. FERRARI²⁾, Maria C. R. LUVIZOTTO²⁾ and Tereza C. CARDOSO^{2)*}

¹⁾ *Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, Uberlândia, MG, Brazil* ²⁾ *São Paulo State University, Faculdade de Odontologia, Curso de Medicina Veterinária, Laboratório de Patologia, DCCR e Laboratório Virologia, DAPSA, Rua Clóvis Pestana, 793, UNESP, SP, CEP 16.050-680, Brazil.*

*Correspondence to:

Cardoso, T.C.
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal (DAPSA)
Curso de Medicina Veterinária
Rua Clóvis Pestana, 793.
16.050-680 Araçatuba, SP, Brasil.
Fax: +55-18-622 6487
e-mail: tcardoso@fmva.unesp.br

ABSTRACT. The reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of turkey astrovirus (TAsV) capsid and polymerase gene was applied in the bursa of Fabricius (BF), thymus (TH), spleen (SP) and cloacal swabs (CS) from young poult with PEMS (Poult Enteritis Mortality Syndrome). The histological lesions were atrophy, lymphoid depletion, cellular infiltration and necrosis of BF, TH and SP, respectively. The RT-PCR reactions were positive in all of 100 CS, 7 out of 10 of BF, 10 out of 20 TH and SP, respectively, for the polymerase gene of TAsV-2. Five out of 10 TH and SP samples, considered as negative by RT-PCR, were positive when specific primers designed to the TAsV-2 capsid gene were applied. Finally, this is the first description of turkey astrovirus infection presenting PEMS in Latin America.

KEY WORDS: PEMS, poult enteritis complex and turkey astrovirus.

Poult enteritis mortality syndrome (PEMS) is a highly infectious disease of young turkeys characterized by diarrhea, stunting, immunosuppression, and high mortality [3, 11]. "Poult enteritis complex" (PEC) is a pathological condition in young turkeys, characterized by mild diarrhea, immunosuppression and low mortality [1].

Turkey astrovirus (TAsV) has been incriminated in both PEMS and PEC outbreaks, associated to other pathogens [11]. Besides, it was firstly described in 1980 in the United Kingdom, and later identified in 1985 in the United States, identified as TAsV-1 [6,9]. Ten years later, a second type, which was genetically distinct from the first isolate, was detected circulating in the United States designated as TAsV-2 [5]. There are no reports on TAsV infection in turkeys in Latin America although it was reported in the United States.

In general, astrovirus is small, non-enveloped, positive sense ssRNA virus associated with enteric disease, incriminated to result in more economic loss than those affecting any other system in humans, mammalian and avian species [9, 10]. In order to overcome the inexistence of vaccine, bio-security measures are essential to avoid virus infection and spread [4, 7, 8].

In this study, to verify the TAsV-2 and/or TAsV-1 infection among Brazilian young poults (45-day-old), suffering from lymphoid atrophy and mild enteric disorder, bursa of Fabricius – BF (n=10), thymus – TH (n=20), spleen - SP (n=20) and cloacal swabs – CS (n=100) were collected and analysed by histopathology and RT-PCR, respectively.

The BF, TH and SP were fixed in 10% neutral buffered formaldehyde during 24hr, embedded in paraffin and sectioned for conventional histopathology investigation [17, 18]. The RNA extraction, from CS and tissue suspensions, was

performed following the same procedure established before [17]. In our laboratory no Astrovirus is available, so it was not used TAstV-2 as positive reference control in this study to verify the specificity, however other RNA virus, as infectious bronchitis virus (IBV), was included as negative control [4, 7, 8].

The first set of primers, MKPOL10 (forward) and MKPOL11 (reverse) were used to amplified 802-bp fragment within the polymerase gene of TAstV [5]. The second set of primers named TAst_Cap_F and TAst_Cap_R described as being able to amplify the capsid-protein-encoding genes were used (GenBank accession numbers Y15936 and AF206663) with respective expected size of 236 for TAstV-1 and 222bp for TAstV-2. [2]. An internal RT-PCR control, beta actin gene loci of *Meleagris gallopavo* genome was included as a house keeping gene. The oligonucleotides were: beta actin forward (5'- AAGATCTGGCACCACACTTTC- 3') and beta actin reverse (5'- ACAGCTTCTCCTTGATGTCAC- 3') reported in GenBank accession number X00182, able to produced a fragment around of 400bp [2, 5,14, 15]. The RT-PCR was performed following the instructions of "One-step Superscript III®" RT-PCR commercial kit (Invitrogen), using 2µl of the total RNA as a template for amplification in a final volume of 50µl/reaction. A total of 10µl of PCR products were electrophoresed, visualized by ethidium bromide staining and documented. All the RT-PCR products were directly sequenced using the BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) using the same set of primers in order to confirm the identity of the amplified products [13-16].

The BF lymphoid follicles showed mild to moderate destruction and depletion, especially observed in the medulla. A great number of lymphoblast cells

accomplished by follicular atrophy and necrosis. The thymus showed follicles depletion, intense necrosis and diffuses inflammatory cells. Spleen showed diffuse necrosis areas (data not shown). All these changes characterize the immune dysfunction observed by clinical signs as being mild enteritis, low growth performance and mild diarrhoea.

The expected products of around 802bp and 222bp were considered positive. All CS (100/100), 7 out of 10 BF, and 10 out of 20 TH and SP, confirmed the amplification of polymerase gene of TAsTV-1 and TAsTV-2 (Fig.1A and B). Respective sequencing and comparison by BLAST search confirmed the identity of these amplified products as belonging to the polymerase gene related to the TAsTV-2 ORF1b (data not shown). The second set of primers for the ORF2, allowed us to obtain 5 amplified products of 222 bp (Fig. 1C) in 10 out of 20 samples (TH and SP), considered negative for the first set of primers. The sequences revealed a similarity of 98% with TAsTV-2 North Carolina Q/34/1990 strain (data not shown).

Regarding to TAsTV diagnosis, the electron microscopy is the most reliable technique usually performed for virus diagnosis. However these viruses share similar morphological features. The fluorescent antibody assay and the RT-PCR are more appropriated [6, 11, 12]. In this study, it was possible to amplify the polymerase gene of TAsTV-2 from all CS assayed by simple RT-PCR. Real time and multiplex RT-PCR assays are described as being faster although complicate enzyme catalytic reaction could lower the sensitivity by causing false negative results [14, 15, 17]. For instance, a very high homology between our results from

ORF 1b and ORF2 sequences, suggest the presence of TAsV-2 (Carolina/034/1999) strain in Latin America.

In fact, differences in pathogenesis were also described, especially when embryos and turkeys have been experimentally infected by these different isolates TAsV2001 and TAsV1987 [12]. However, only TAsV1987 induced lesions in the bursa and no alteration was visualized in the thymus. Afterwards, the TAsV1987 isolated seems cause impairment of the immune system. These reports suggested genomic changes in the new isolated TAsV 2001, probably occasioned by followed infections with differences in the biological properties [16].

In conclusion, the present study suggests TAsV may infect the turkeys in Brazil and may be associated with the pathogenesis of PEC. Further experimental studies are necessary to elucidate the possibility of this virus be incriminated on PEC.

ACKNOWLEDGMENTS: This work was partly supported by FAPESP and CAPES.

REFERENCES

1. Barnes, H.J., Guy, J.S. and Vaillancourt, J-P. *Rev sci tech Off. Int. Epiz.* **19**:565-588.
2. Cattoli, G., Battisti, C De., Toffan, A., Salviato, A., Lavazza, A., Cerioli, M. and Capua, I. 2006. *Arch. Virol.* **152**:595-602.
3. Culver, F., Dziva, F., Cavanagh, D. and Stevens, M.P. 2006. *Vet. Rec.* **159**:209-210.
4. Guy, J.S., Miles, A.M., Smith, L., Fuller, F.J. and Schultz-Cherry, S. 2004. *Avian Dis.* **48**:206-211.

5. Koci, M.D., Seal, B.S. and Schultz-Cherry, S. 2000. *J. Virol. Meth.* **90**:79-83.
6. McNulty, M.S., Curran, W.L. and McFerran, J.B. 1980. *Vet. Rec.* **106**:561.
7. Patin-Jackwood, M.J., Spackman, E. and Woolcock, P.R. 2006a. *Virus Genes* **32**:187-192.
8. Patin-Jackwood, M.J., Spackman, E. and Woolcock, P.R. 2006b. *Avian Dis.* **50**: 397-404.
9. Saif, L.J., Saif, Y.M. and Thail, K.W. 1985. *Avian Dis.* **29**:798-811.
10. Saif, Y.M., Saif, L.J., Hofarce, C.L., Hayhow, C., Swayne, D.E. and Dearth, R.N. 1990. *Avian Dis.* **34**:762-764.
11. Schultz-Cherry, S., Kapczynski, D.R., Simmons, U.N., Koci, M.D., Brwon, C. and Barnes, H.J. 2000. *Avian Dis.* **44**:256-265.
12. Sellers, S.H., Koci, M.D., Linnemaun, E., Kelley, L. and Schultz-Cherry, S. 2004. *Avian Dis.* **48**:531-539.
13. Tang, Y. and Saif, M. 2004. *Avian Dis.* **48**:896-901.
14. Tang, Y., Murgia, M.V. and Saif, Y.M. 2005a. *Avian Dis.*, **49**:514-519.
15. Tang, Y., Wang, Q. and Saif, Y.M. 2005b. *J. Virol. Meth.* **126**:81-86.
16. Tang, Y., Murgia, M.V., Ward, L. and Saif, Y.M. 2006. *Avian Dis.* **50**: 526-531.
17. Teixeira, M.C.B, Luvizotto, M.C.R., Ferrari, H.F., Mendes, A. R. and Cardoso, T.C. 2007. *Avian Pathol.* **36**:29-33.
18. Thouvenelle, M.L., Haynes, J.S. and Reynolds, D.L. 1995. *Avian Dis.* **39**:328-336.

Figures captions

Fig.1. Agarose gel electrophoresis of the RT-PCR products: MW- Molecular Marker 1Kb plus; 1A) Positive field samples from: CS- cloacal swabs; BF- suspension from bursa of Fabricius using first set of primers MKPOL10 and MKPOL11 (arrow showing negative result obtained from thymus suspension); 1B) Positive field sample from thymus (TH) using second set of primers TAs_t_Cap_F and TAs_t_Cap_R (arrow); 1C) Positive field sample from the spleen suspension using the first set of primers MKPOL10 and MKPOL11 (arrow).

Anexo II – LISTA DE REAGENTES

1. Ácido bórico (PM 61,83 Gibco BRL[®])
2. Agarose ultra-pura (Gibco BRL[®])
3. Brometo de etídeo (PM 394,3 Invitrogen[®])
4. dNTP mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Invitrogen[®])
5. EDTA dissodium (Gibco BRL[®])
6. Etanol (Merck[®])
7. Formol 10% (Merck[®])
8. Kit Superscript III one step RT-PCR (Invitrogen[®] USA)
9. MEM – meio essencial mínimo (Gibco BRL[®])
10. Oligonucleotídeos iniciadores (Invitrogen[®])
11. Padrão de peso molecular 1Kb plus (Invitrogen[®])
12. Proteinase K (Gibco BRL[®])
13. SDS (Sigma[®])
14. TRIS (hidroximetil amino metano) (PM 121,14 Gibco BRL[®])
15. TRizol (Invitrogen[®])

Anexo III – SOLUÇÕES E TAMPÕES

A) Solução de lise:

- 0,1 mM TRIS (Gibco BRL[®])
- 0,01mM EDTA (Gibco BRL[®])
- 0,1% SDS (Sigma[®])
- H₂O bidestilada qsp. 1000 mL
- pH 8,4

B) Tampão de corrida para eletroforese em gel de agarose: Tris-ácido bórico-EDTA) 10 X []:

- 89 mM TRIS (Gibco BRL[®])
- 89 mM ácido bórico
- 2 mM EDTA dissodium
- H₂O bidestilada qsp. 1000 mL
- pH 8,4

C) Gel de agarose 2%

- 1 g de agarose
- TEB (Tris-ácido bórico – EDTA)
- Aquecer até dissolver a agarose
- Adicionar 15 µL de brometo de etídeo (0,5 µg/mL)

D) Álcool 70%

- Álcool etílico hidratado MERCK 92,8° INMP-95,0° GL 35,71 mL
- H₂O bidestilada qsp. 100 mL

Anexo IV – PROTOCOLOS PARA PREPARO DE SUSPENSÕES

A) Suspensões de swabs cloacais

1. Suabes cloacais com conteúdo fecal
2. Transporte em temperatura de até 4°C
3. Imersão individual em 200 mL de solução de lise em tubos cônicos de 1,5 mL, livres de DNA/RNA e autoclavados 3 vezes consecutivas
4. Banho-maria a 37°C por 30 min.
5. Centrifugar a 3.000 x g por 15min.
6. Retirar os suabes e submeter o conteúdo líquido ao método do TRizol[®] (Invitrogen[®]) para extração de RNA total

B) Suspensões de bursa, timo e baço

1. Fragmentos de bursa, timo e baço, acondicionados ao gelo
2. Pesar 2 g de cada órgão em papel alumínio autoclavado, utilizando tesouras e pinças individuais, autoclavadas três vezes consecutivas
3. Com auxílio de cadinhos e pistilos de porcelana, autoclavados três vezes consecutivas submeter a digestão mecânica de cada fragmento, em momentos diferentes para evitar contaminação cruzada
4. Realizar a digestão mecânica em fluxos laminares Classe II e ligar a luz ultravioleta entre cada etapa do processo
5. Adicionar 3 mL de MEM aos fragmentos de 2 g e após a desintegração mecânica, adicionar 20 µg/mL de proteinase K
6. Aguardar alguns minutos e submeter à centrifugação em tubos cônicos estéreis de 15 mL, a 3.500 x g por 15min.
7. Remover o sobrenadante e retirar 200 µL para a extração de RNA pelo método do Trizol[®] (Invitrogen[®])
8. Guardar o restante em tubos de criopreservação em freezer -86°C