

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

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA DE PARVOVIRUS DE
GALINHA (ChPV) EM FRANGOS DE CORTE SAUDÁVEIS E COM
SÍNDROME DA MÁ ABSORÇÃO**

Dissertação de Mestrado

Fabrine Finkler

Porto Alegre

2015

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

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA DE PARVOVIRUS DE
GALINHA (ChPV) EM FRANGOS DE CORTE SAUDÁVEIS E COM
SÍNDROME DA MÁ ABSORÇÃO**

Médica Veterinária: Fabrine Finkler

Dissertação apresentada como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências Veterinárias na Área de Medicina
Veterinária Preventiva – Virologia.

Orientadora: Ana Cláudia Franco

Co-Orientador: Paulo Michel Roehle

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Finkler, Fabrine

Detecção e quantificação do genoma de parvovirus de galinha (ChPV) em frangos de corte saudáveis e com síndrome da má absorção / Fabrine Finkler. -- 2015. 67 f.

Orientadora: Ana Cláudia Franco.

Coorientador: Paulo Michel Roehe.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Parvovirus. 2. Frangos de corte. 3. Síndrome da má absorção. 4. qPCR. I. Franco, Ana Cláudia, orient. II. Roehe, Paulo Michel, coorient. III. Título.

Fabrine Finkler

“DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO GENOMA DE PARVOVIRUS DE GALINHA (ChPV) EM FRANGOS DE CORTE SAUDÁVEIS E COM SÍNDROME DA MÁ ABSORÇÃO”

Aprovada em 27 MAR 2015

APROVADO POR:

Prof^ª Dr^ª Ana Cláudia Franco
Orientadora e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Luiz Cesar Bello Fallavena
Membro da Comissão

Dr. André Felipe Streck
Membro da Comissão

Dr. Fabrício Souza Campos
Membro da Comissão

Dedico a presente monografia a
todos os seres iluminados que me
acompanham em minha
caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre ter iluminado todos os meus caminhos e todas as minhas decisões, dando-me saúde e oportunidades para alcançar esta conquista.

Aos meus pais, Sidônia e Renato, pelos valores repassados e ao incentivo à educação. Divido com vocês, com muito orgulho, a realização desta etapa.

Especialmente ao meu namorado, João Fernando, por ser uma pessoa especial e que sempre esteve ao meu lado. Obrigada pelo incentivo, compreensões e apoio mais próximo.

Agradeço a minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Ana Cláudia Franco, e ao meu co-orientador, Prof. Dr. Paulo Michel Roehle, que juntos me incentivaram à pesquisa. Obrigada pelo exemplo de seriedade e dedicação à pesquisa, pelo apoio e pelo conhecimento que me foram passados durante esta jornada. Agradeço às grandes oportunidades e confiança que em mim depositaram.

Aos colegas de laboratório do IPVDF e do ICBS que sempre se dispuseram em me ajudar. Agradecimento especial ao Samuel, Thais, Helton, Diane e Cristine, pelos conhecimentos repassados e pela disponibilidade e auxílio na realização deste trabalho. A todos, obrigada pela receptividade, paciência, amizade, parceria, incentivo, companheirismo e ensinamentos repassados.

A Dr.^a Laura, pela atenção que me foi dada, incentivo e a disponibilidade em ajudar sempre que possível. Igualmente, agradeço a todas as pessoas que de certa forma contribuíram para a realização desta etapa.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, ao FINEP e CAPES pelo financiamento parcial para o desenvolvimento do projeto.

Especial agradecimento aos animais e plantas, que serviram como fonte de aprendizagem, pesquisa e estudo durante todos esses anos de formação.

*“Tudo vale a pena se a alma não é pequena”
Fernando Pessoa*

RESUMO

A síndrome da má absorção (SMA), caracterizada pelo mau desenvolvimento e desuniformidade do lote de aves, causa importantes prejuízos econômicos à avicultura comercial. No entanto, por se tratar de uma doença multifatorial e possivelmente polimicrobiana, o envolvimento do parvovírus de galinha (ChPV) na ocorrência da SMA ainda é pouco conhecido. Com o propósito de elucidar a possível associação entre a presença do ChPV e a ocorrência da SMA, foram desenvolvidas e aplicadas ferramentas moleculares para a detecção e quantificação do ChPV em amostras de frangos comerciais no Estado do Rio Grande do Sul. Uma PCR quantitativa foi desenvolvida para detectar e quantificar cópias do genoma (CG) do ChPV em amostras de suabes de cloaca de 59 frangos saudáveis e 68 frangos com sinais clínicos sugestivos de SMA. Os resultados revelaram que todas as amostras dos dois grupos investigados, continham o genoma do ChPV. No entanto, a carga viral em frangos com SMA foi significativamente ($p \leq 0,0001$) maior (1×10^5 CG/100 ng DNA) do que em frangos saudáveis ($1,3 \times 10^3$ CG/100 ng DNA). Adicionalmente às amostras de cloaca, o ChPV também foi investigado em amostras de tecidos (fígado, timo, baço, bursa de Fabricius - BF e intestino) e soros provenientes de nove frangos saudáveis e 50 frangos com sinais indicativos da SMA. O ChPV foi encontrado tanto em aves saudáveis como nas aves com SMA, no entanto, observou-se uma diferença na distribuição deste agente nos tecidos analisados. O genoma do vírus foi mais frequentemente detectado na BF, baço e intestino das aves com SMA, sendo que o intestino foi o tecido que apresentou maior carga viral. Os resultados encontrados nestes estudos demonstraram que o genoma viral estava altamente disseminado nas aves investigadas. Além disso, observou-se uma maior carga viral em frangos de corte com SMA quando comparado com aves sadias. Com base nos resultados encontrados, sugere-se que a maior carga viral de ChPV existente em aves com SMA, em relação a aves saudáveis, seja um dos fatores que favoreça a ocorrência da síndrome.

Palavras-chave: *Parvoviridae*, avicultura, runting-stunting syndrome (RSS).

ABSTRACT

The malabsorption syndrome (MAS), characterized by the poor development and lack of uniformity of chicken flocks, causes significant economic losses to commercial poultry. However, because it is a multifactorial and possibly polymicrobial disease, the involvement of Chicken parvovirus (ChPV) in the MAS occurrence is still not clear. In order to elucidate the possible association between the presence of ChPV and the occurrence of MAS, molecular tools were developed and applied for the detection and quantification of ChPV DNA in commercial poultry samples in the state of Rio Grande do Sul. A quantitative PCR was developed to detect and quantify the ChPV genome copies (GC) in cloacal swab samples of 59 healthy broilers and 68 broilers with clinical signs suggestive of MAS. The results showed that all investigated samples of the two groups contained the genome ChPV. However, viral loads in MAS-affected animals were significantly ($p \leq 0.0001$) higher (1×10^5 GC/100 ng DNA) than in healthy broilers (1.3×10^3 GC/100 ng DNA). In addition to the cloacal samples, the presence of ChPV DNA was also investigated in tissue samples (liver, thymus, spleen, bursa of Fabricius - BF and intestine) and sera from nine healthy broilers and 50 broilers with signals indicative of MAS. The ChPV was found in healthy avian as well MAS-affected, however, there was a difference in the distribution of this agent in those tissues. The virus genome was more frequently detected in the BF, spleen and intestines of the MAS-affected broilers, and the intestines contained the highest viral loads, in comparison with other tissues. Our results demonstrated that the viral genome can be found in both healthy and MAS-affected broilers. In addition, higher viral loads were detected in broilers with signs suggestive of MAS compared to healthy birds. Based on these results, it is suggested that the greatest viral load of ChPV existing in MAS-affected broilers when compared to healthy birds, is one of the factors that favor the occurrence of the syndrome.

Keywords: *Parvoviridae, poultry, runting-stunting syndrome (RSS).*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Árvore filogenética mostrando gêneros propostos para a família <i>Parvoviridae</i>	15
Figura 2 - Ilustração da estruturada subfamília <i>Parvovirinae</i>	17
Figura 3 - Representação gráfica da estrutura do genoma viral <i>Chicken parvovirus</i> (ChPV)	18
Figura 4 - Resumo sobre as etapas envolvidas no processo de replicação de parvovirus autônomos	20
Figura 5 - Imagem de frango de corte com sinais clínicos sugestivos da SMA.	24
Figura 6 - Ilustração dos sinais clínicos descritos na SMA em frangos de corte.....	25

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1 Histórico	14
2.2 Taxonomia.....	14
2.3 Propriedades físico-químicas	16
2.4 Descrição do agente.....	16
2.5 Replicação viral	18
2.6 Epidemiologia do ChPV	20
2.7 Transmissão.....	21
2.8 Caracterização da SMA.....	22
2.9 Fatores não infecciosos envolvidos na SMA	22
2.10 Patogenia e sinais clínicos	23
2.11 O ChPV na SMA	24
2.12 Resposta imunológica.....	25
2.13 Morbidade e mortalidade.....	26
2.14 Diagnóstico.....	26
2.15 Profilaxia e tratamento	27
3 OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4 ARTIGOS CIENTÍFICOS	29
4.1 CAPÍTULO 01	30
4.2 CAPÍTULO 02	43
5 DISCUSSÃO GERAL	58
6 CONCLUSÕES	60
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
ANEXO A - Parecer favorável à pesquisa concedido pelo CEUA – IPVDF.....	67

1 INTRODUÇÃO

A avicultura é um importante segmento do agronegócio brasileiro que se destaca pela elevada produção de carne de frango. Nesse cenário, o Brasil mantém-se no posto de país líder nas exportações mundiais e terceiro maior produtor de carne de frango no mundo (UBABEF, 2014).

Os elevados índices produtivos da indústria avícola brasileira estão associados à característica de produção intensiva, ciclo rápido e elevada densidade de animais. Em consequência disso, uma crescente pressão incide sobre os indivíduos, que associado à falta de programas eficientes de biossegurança e sanidade, beneficia o surgimento e o desencadeamento de patologias responsáveis por importantes perdas econômicas no setor avícola (GUIMARÃES & LEFFER, 2009; DESOUZART, 2011).

Dentre essas enfermidades, encontra-se a síndrome da má absorção (SMA), também descrita por MAS “*Malabsorption syndrome*” (REBEL *et al.*, 2006; MARTINS & RESENDE, 2009). Essa síndrome é caracterizada pela presença de distúrbios entéricos em aves, que reflete em baixa eficiência alimentar e queda direta da produtividade (GUY, 1998; ITO *et al.*, 2009). A SMA foi relatada pela primeira vez na década de 1940, entretanto, tornou-se mais evidente a partir da década de 1970. Desde então, tem sido reportada em todo o mundo com diferentes nomes: doença entérica (DE), síndrome do refúgio fisiológico ou refugagem, síndrome da desuniformidade tardia (*Runting Stunting Syndrome*; RSS), síndrome da cloaca suja, síndrome do nanismo (*Stunting Syndrome*; SS) e síndrome do raquitismo (KISARY *et al.*, 1984; GUY, 1998; REBEL *et al.*, 2006).

A participação do parvovírus de galinha (*Chicken parvovirus*; ChPV) na SMA em frangos foi proposta na década de 1980, quando partículas do vírus foram identificadas em aves com sinais de retardo do crescimento (KISARY *et al.*, 1984). Fundamentando-se na hipótese de que os parvovírus são agentes conhecidos por causar importantes doenças em hospedeiros mamíferos e em outras espécies de aves (BERNS & PARRISH, 2013; COTMORE *et al.*, 2014), acredita-se que o ChPV tenha um importante papel no desenvolvimento da SMA em frangos. Colaboram para essa suposição as inoculações experimentais com o ChPV em aves, as quais demonstraram sinais clínicos sugestivos da síndrome (KISARY, 1985; ZSAK *et al.*, 2013).

No entanto, o papel do ChPV nessa patologia permanece pouco esclarecida até o momento, uma vez que outros agentes virais e bacterianos são descritos na etiologia da síndrome. Além disso, esses agentes também são encontrados em aves saudáveis, incluindo o ChPV (PALADE *et al.*, 2011; DOMANSKA-BLICHARZ *et al.*, 2012).

Em vista disso, o presente estudo tem como propósito de elucidar a possível associação entre a presença do ChPV e a ocorrência da SMA. Para isso, foram desenvolvidas e aplicadas ferramentas de diagnóstico molecular para a detecção e quantificação do ChPV em amostras de tecidos (fígado, timo, baço, bursa de Fabricius e intestino) soro e suabes cloacais de frangos de corte comerciais saudáveis e frangos com a SMA.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Histórico

O termo que origina o nome da família *Parvoviridae* tem suas origens no latim (*parvus* = pequeno). Esse termo foi adotado tendo em vista o pequeno tamanho das partículas virais identificadas (MORAES & COSTA, 2012).

Em aves, o parvovírus já foi descrito infectando diferentes espécies. Durante os anos de 1960, em muitos países europeus, foi relatada uma doença de alta letalidade em gansos e patos, a qual era conhecida como “doença de *Derzsy*” (DERZSY *et al.*, 1970). Uma década depois, em 1971, parvovírus foram identificados como sendo os agentes causadores da doença nessas aves (SCHETTLER, 1971); sendo nomeados mais tarde de parvovírus de ganso (*Goose parvovirus*; GPV) e parvovírus de pato (*Muscovy duck parvovirus*; MDPV) (KISARY & DERSZY; 1974; SAIF, 2013). O parvovírus de perus (*Turkey parvovirus*; TuPV) foi identificado pela primeira vez em 1983 e parece estar associado à síndrome da enterite e mortalidade (*poult enteritis and mortality syndrome*; PEMS) em perus jovens (TRAMPEL *et al.*, 1983; GUY, 1998).

Em galinhas, o primeiro isolamento de um parvovirus foi relatado em 1984, na Hungria. A presença de partículas virais foi demonstrada através da microscopia eletrônica (ME) de homogenizados intestinais de aves com sinais de retardo do crescimento (KISARY *et al.*, 1984). Somente anos mais tarde foi realizado o sequenciamento parcial do genoma do ChPV (ZSAK *et al.*, 2008). Em 2010, foi publicada a primeira sequência completa do genoma do ChPV (DAY & ZSAK, 2010).

2.2 Taxonomia

A família *Parvoviridae* é composta por duas subfamílias: *Parvovirinae*, que infecta os vertebrados e *Densovirinae*, que infecta os insetos (BERNS & PARRISH, 2013). Um conjunto de propostas para racionalizar e ampliar a taxonomia da família *Parvoviridae* foi aceito pelo *International Committee on Taxonomy of Virus* (ICTV), conforme a árvore filogenética da Figura 1. Segundo esta análise, a subfamília *Parvovirinae*, que era distribuída nos gêneros *Parvovirus*, *Erythrovirus*, *Dependovirus*, *Amdovirus* e *Bocavirus* passa a compor uma nova nomenclatura, totalizando oito gêneros: *Erithroparvovirus*, *Dependoparvovirus*, *Amdoparvovirus*, *Bocaparvovirus*,

Protoparvovirus, *Copiparvovirus*, *Tetraparvovirus* e o gênero *Aveparvovirus*, ao qual pertence o parvovirus de galinha (COTMORE *et al.*, 2014).

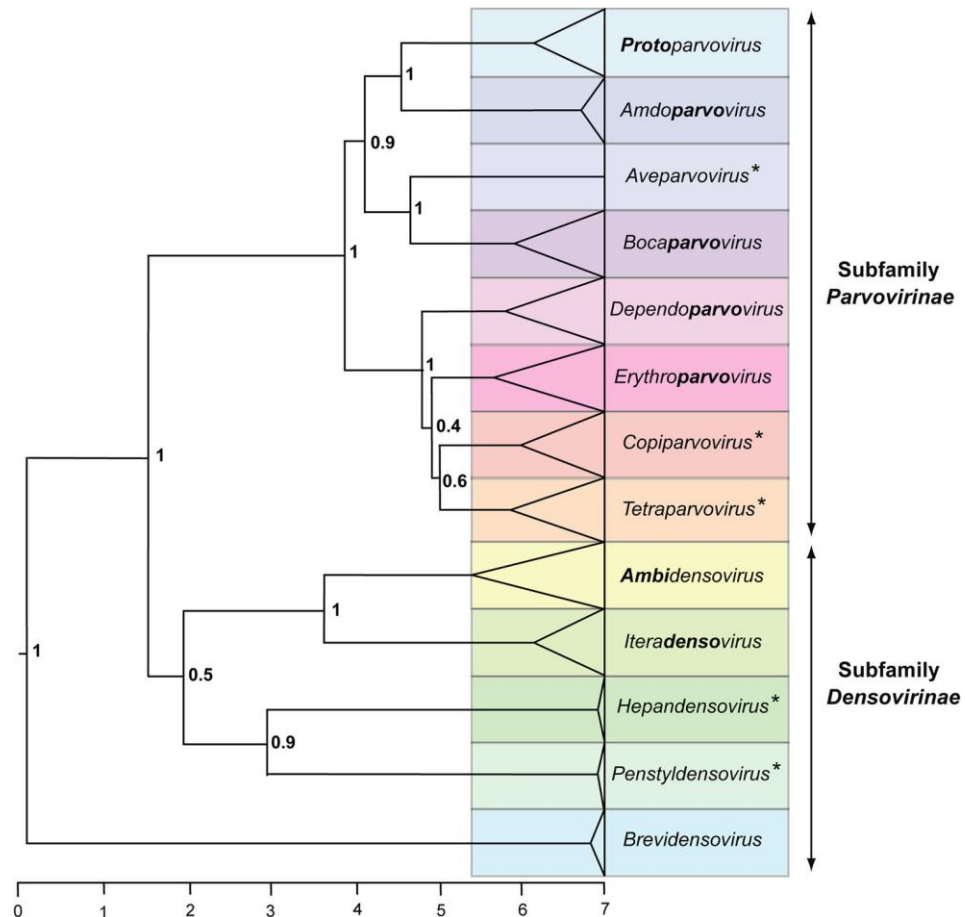


Figura 1 - Árvore filogenética mostrando gêneros propostos para a família *Parvoviridae*. O negrito nos nomes dos gêneros indica a afiliação da subfamília. Os asteriscos indicam os nomes dos novos gêneros. Fonte: Cotmore *et al.* (2014).

A nova proposta taxonômica classifica a espécie *Galliform aveparvovirus 1*, em duas variantes, entre eles: *Chicken parvovirus ABU-P1* (GU214704) e *Turkey parvovirus 260* (GU 214706) (COTMORE *et al.*, 2014). Alguns trabalhos sugerem que o ChPV e o TuPV poderiam ter derivados de um ancestral comum, e que com o passar do tempo, uma possível evolução adaptativa entre as espécies tenha ocorrido (ZSAK *et al.*, 2009; DAY & ZSAK, 2010; DOMANSKA-BLICHAZ *et al.*, 2012). Essa característica difere do GPV e do MDPV, pertencentes ao gênero *Dependoparvovirus*, cujos genomas parecem ter permanecido estáveis ao longo do tempo sem apresentar a característica de transmissão entre as espécies (ZSAK *et al.*, 2009).

2.3 Propriedades físico-químicas

Os parvovírus possuem grande estabilidade no meio ambiente e, em determinadas condições, podem manter-se infecciosos durante meses. Essa característica é atribuída a sua estrutura compactada e ausência de envelope viral (MORAES & COSTA, 2012). Os integrantes dessa família são resistentes a uma larga faixa de potencial de hidrogênio-pH (3,0 até 11,9) e também ao calor úmido (80 °C por 1 hora). Por outro lado, podem ser inativados a 90 °C por 10 minutos, formol a 5%, β -propiolactona, hidroxilamina e agentes oxidantes (BOSCHETTI *et al.*, 2003; BERNS & PARRISH, 2013). O etanol a 70% durante 10 minutos apresenta baixa atividade contra o parvovírus. No entanto, o hipoclorito de sódio a 25.000 ppm e o ácido peracético (0,2%) são eficazes na eliminação do agente (ETERPI *et al.*, 2009; ENTERPI *et al.*, 2010).

2.4 Descrição do agente

Parvovirinae são compostos por pequenos vírus esféricos, de 18 a 26 nanômetros (nm) de diâmetro, com capsídeo icosaédrico (BERNS & PARRISH, 2013). A Figura 2A, a seguir, ilustra uma imagem das partículas do ChPV visualizados na microscopia eletrônica. Os parvovirus possuem em sua superfície estruturas características como as depressões (*dimples*), as projeções ou protuberâncias (*spikes*), e estruturas na forma de cilindros circundados por depressões (*canyons*) (MUZYCZKA & BERNS, 2001). As Figuras 2B e 2C ilustram um modelo indicando o capsídeo viral. Por não existir um exemplar desenvolvido para o ChPV, optou-se pela escolha de um representante filogeneticamente mais próximo ao *Aveparvovirus*, neste caso o gênero *Bocaparvovirus* (COTMORE *et al.*, 2014).

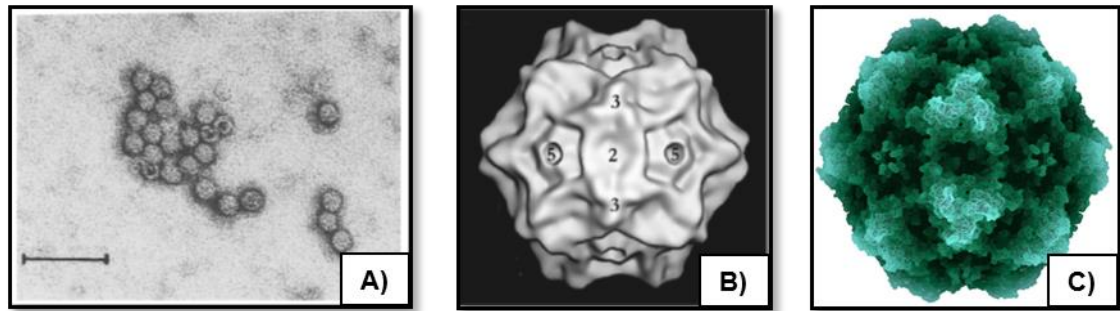


Figura 2 – Ilustração da estruturada subfamília *Parvovirinae*. A) Fotomicrografia eletrônica de partículas de parvovirus (ChPV) ABU-P1 (Kisary *et al.*, 1985). B) Modelo incluindo as estruturas na superfície do capsídeo viral. Depressões ou *dimples* (2); projeções ou *spikes* (3) e cilindros circundados por depressões ou *canyons* (5) (Muzyczka & Berns, 2001). C) Modelo dinâmico da estrutura do capsídeo do parvovirus canino, pertencente ao gênero *Bocaparvovirus*, filogeneticamente mais próximo ao *Aveparvovirus*, com as estruturas de superfície em posição similar a encontrada na ilustração “b” (Xie & Chapman, 1999).

O envoltório viral apresenta importantes funções biológicas, entre eles: o reconhecimento e a ligação a receptores celulares (depressões) e a determinação das características imunogênicas (projeções). A massa viral dos parvovírus é de 5,5 até 6,2 x 10⁶ Da (Daltons) e a densidade dos vírions varia de 1,39 a 1,42 g/cm³ em gradiente de cloreto de cézio (BERNS & PARRISH, 2013).

Com relação ao genoma, o parvovírus é constituído de DNA linear, tamanho variando entre 4 a 6 Kb. As extremidades da molécula de DNA possuem sequências complementares invertidas (*palíndromes*) que são conhecidas como repetição terminal invertida (*Inverted terminal repeats - ITRs*), conforme Figura 3 (BERNS & PARRISH, 2013). Essas sequências permitem que as extremidades do genoma se dobrem sobre si mesmas, pareando com sua região complementar e formando uma estrutura semelhante a um grampo de cabelo (*hairpin*). Essas estruturas são importantes para iniciar o processo da replicação e produção de vírions (FLORES, 2007; COTMORE & TATTERSAL, 2013).

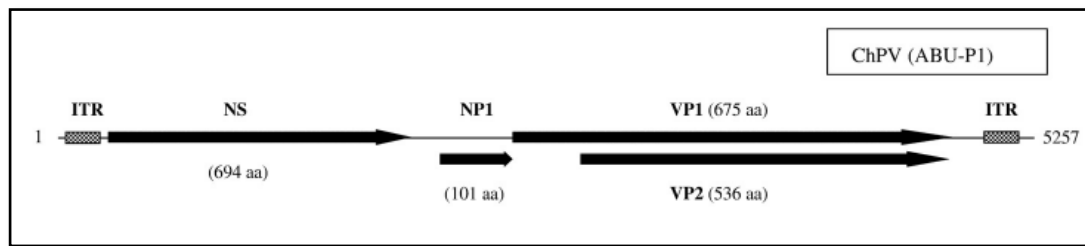


Figura 3 - Representação gráfica da estrutura do genoma viral *Chicken parvovirus* (ChPV). NS: Proteína não estrutural. VP: Proteína estrutural viral. ITR: Repetição terminal invertida. Fonte: Day & Zsak (2010).

No genoma do ChPV são descritas três fases abertas de leitura (*open reading frames*; ORFs). A primeira região promotora encontra-se na extremidade 5' do genoma, possui 2085 nt de comprimento que possivelmente codifica a sequência de aminoácidos (aa) da proteína não estrutural NS-1 (694 aa). A segunda ORF, na extremidade 3' do genoma, possui 2028 nt e codifica as proteínas estruturais VP1 (675 aa), VP2 (536 aa) e possivelmente uma proteína VP3, como descrito em outros parvovírus (ZADORI *et al.*, 1995; DAY & ZSAK, 2010). O genoma contém também outra pequena ORF de 306 nt, localizada entre as duas maiores antes descritas. Esta terceira região promotora, também encontrada nos membros do gênero *Bocaparvovirus*, parece gerar uma proteína nuclear hiperfosforilada (NP1) (DAY & ZSAK, 2010; COTMORE & TATTERSAL, 2013).

2.5 Replicação viral

Não foi descrito, até o momento, nenhum estudo detalhado sobre os processos e fatores essenciais ou principais envolvidos exclusivamente na replicação viral do parvovirus de galinha (ChPV). Dessa forma, presume-se que a replicação do ChPV ocorra no núcleo da célula hospedeira e as etapas envolvidas nos processos sejam semelhantes aos parvovirus autônomos. A definição de parvovírus autônomos vem da classificação da subfamília *Parvovirinae* (que infectam vertebrados), que são caracterizados por demandarem ou não da presença de um vírus auxiliar na mesma célula (adenovírus ou herpesvírus) para que a infecção produtiva ocorra (BERNS & PARRISH, 2013).

A replicação dos parvovírus é dependente da fase S (*synthesis*) do ciclo mitótico celular. Nessa fase a célula expressa os fatores necessários para a duplicação do DNA cromossômico, fatores esses utilizados pelo vírus para sua replicação (MORAES &

COSTA, 2012; BERNS & PARRISH, 2013). *In vivo*, essa característica se reflete na maior gravidade das infecções observada em animais jovens. Dessa forma, a infecção pode ser sistêmica em fetos e em animais recém-nascidos, nos quais ocorre uma síntese celular generalizada; enquanto que, em animais mais velhos as infecções estão geralmente mais restritas a alguns tecidos, como o epitélio intestinal (células das criptas do intestino) ou em células linfóides (MUZYCZKA & BERNS, 2001).

O ciclo de replicação viral dos parvovírus inicia-se pelo reconhecimento e ligação viral aos receptores da célula hospedeira. Após a adsorção, os parvovírus penetram na célula por endocitose. Nas vesículas endocíticas, parece existir o acúmulo de uma proteína chamada *clatrina*, adjacente aos locais de ligação dos vírions. Essa proteína é conhecida por mediar a ligação dos receptores virais aos endossomos de células infectadas, e estar envolvida em sistemas de transporte intracelular vesicular (FLORES & KREUTZ, 2007; BERNS & PARRISH, 2013). Posteriormente, as partículas virais são transportadas até próximo do núcleo da célula e ao longo desse percurso as proteínas do capsídeo vão sofrendo progressivamente alterações induzidas pela acidificação do endossomo, como a exposição da região amino-terminal da VP1 (BOISVERT *et al.*, 2010; MORAES & COSTA, 2012; BERNS & PARRISH, 2013).

O mecanismo de escape da vesícula endocítica para o citosol e o acesso dos parvovírus ao núcleo ainda não é completamente conhecido. Após o escape da vesícula, ocorre a internalização nuclear. Os poros nucleares são permissíveis à passagem de partículas com até 39 nm de diâmetro, conseqüentemente os parvovírus podem ser transportados intactos ou semi-íntegros ao núcleo (BERNS & PARRISH, 2013; FLORES & KREUTZ, 2007).

A translocação através dos poros nucleares é realizada pelo complexo núcleo proteína (*nucleus protein complex*; NPC) com o auxílio da sinalização da região N-terminal da VP1 (BERNS & PARRISH, 2013). A Figura 4, a seguir, ilustra um resumo proposto sobre as etapas envolvidas no processo de replicação de parvovírus autônomo.

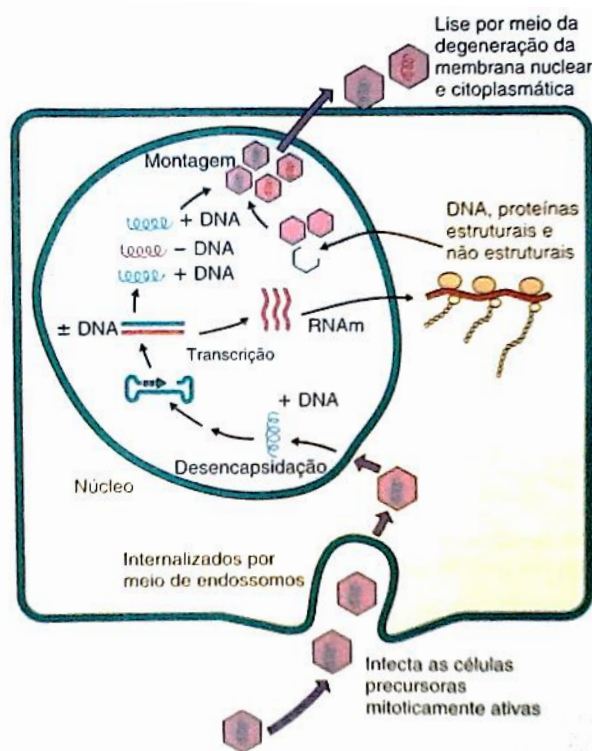


Figura 4

Resumo sobre as etapas envolvidas no processo de replicação de parvovírus autônomo. Adsorção do capsídeo viral e o desnudamento ocorrem. O segmento de DNA é transcrito em mRNA (para a produção de proteínas virais) e à formação de moléculas genômicas. Após, a tradução em proteínas virais, estas são transportadas para o núcleo, onde participarão do processo de morfogênese viral. Na sequência, ocorre a liberação dos vírions.

Fonte: Adaptado de Murray *et al* (2014).

O modelo de replicação mais aceito para os parvovírus é o da produção de cópias genômicas por um mecanismo de círculo rolante modificado, também descrito como amplificação rolante em grampo de cabelo - *rolling hairpin amplification* (COTMORE & TATTERSALL, 2005; BERNS & PARRISH, 2013).

Predominantemente os parvovírus encapsidam cópias de DNA de sentido negativo, as que serão transcritas pela Pol II celular. Entretanto, algumas espécies podem encapsidar também cópias de DNA de sentido positivo e, ocasionalmente uma mistura variável de DNA de ambas as polaridades (sentido positivo e sentido negativo). A liberação dos vírions ocorre por lise das células infectadas (MORAES & COSTA, 2012; BERNS & PARRISH, 2013).

2.6 Epidemiologia do ChPV

O ChPV está amplamente difundido e tem sido identificado tanto em aves aparentemente saudáveis quanto em aves apresentando sinais clínicos sugestivos da SMA (PALADE *et al.*, 2011; DOMANSKA-BLICHAZ *et al.*, 2012). Nos Estados Unidos, 77% (46/60) das amostras de pool intestinal de aves, de diferentes granjas avícolas comerciais com ocorrência de doença entérica, foram positivas para a presença

do genoma do ChPV (ZSAK *et al.*, 2009). Da mesma forma, na Europa amostras de *pools* de fezes de galinhas de diferentes aviários da Espanha, Grécia e Hungria, apresentaram uma elevada taxa de positividade: 73% (22/30) (CARRATALÀ *et al.*, 2012). Na Coreia, o ChPV foi o terceiro vírus mais frequentemente detectado em frangos com sinais clínicos de enterite, presente em 26,5% do total de 34 granjas comerciais analisadas (KOO *et al.*, 2013). Na Polônia, a taxa de detecção do ChPV em aviários comerciais foi menor, entre 17,6% e 22,2% (TARASIUK *et al.*, 2012; DOMANSKA-BLICHAZ *et al.*, 2012).

No Brasil, um estudo investigando genoma de diferentes vírus entéricos de amostras intestinais de frangos comerciais com problemas entéricos revelou que 12,1% (34/280) das amostras analisadas foram positivas para o ChPV. Por outro lado, o vírus não foi encontrado em aves saudáveis (n=68) (METTIFOGO *et al.*, 2014). A descrição de ChPV circulantes em aves de granjas comerciais brasileiras apresentaram alta similaridade com os achados na América do Norte, Europa e Ásia (NUÑEZ *et al.*, 2015).

2.7 Transmissão

Em razão da resistência às condições ambientais, os parvovírus podem manter-se viáveis por um longo período na natureza, sendo neste caso, a via de transmissão horizontal uma importante forma de contágio. Geralmente essa via de transmissão envolve o contato direto com vírions através da rota fecal-oral e pela inalação de aerossóis contendo partículas virais viáveis (MUZYCZKA & BERNIS, 2001; BLOOM & KERR, 2005; CARRATALÀ *et al.*, 2012).

A transmissão vertical do parvovírus tem sido demonstrada em diferentes espécies de mamíferos pela via transplacentar e também em aves, pela via transovariana (BROLL & ALEXANDERSEN, 1996; GOUGH, 1998; MORAES & COSTA, 2012). De igual forma, pesquisadores sugerem que o parvovirus de galinha (ChPV) possa ser transmitido verticalmente (KISARY *et al.*, 1987).

2.8 Caracterização da SMA

O quadro da SMA é caracterizado pela reduzida capacidade absorptiva do trato gastroentérico - TGE (ITO *et al.*, 2009). Em decorrência disso, variados eventos fisiopatológicos ocorrem, resultando na expressão múltipla de manifestações clínicas e patológicas, referidas como um conjunto de sinais clínicos, descritos como complexos ou síndromes (KIM, 2002).

As doenças que acometem o TGE possuem etiologia complexa uma vez que uma série de agentes infecciosos (bacterianos, virais e protozoários) podem resultar em gastroenteropatias. Vários vírus têm sido implicados no quadro clínico de enterites em frangos e perus, dentre eles: os astrovírus, adenovírus, reovírus, coronavírus, picornavírus, circovírus, calicivírus, rotavírus e parvovírus (DECAESSTECKER *et al.*, 1986, GUY, 1998; ZSAK *et al.*, 2009; MARTINS & RESENDE, 2009; METTIFOGO *et al.*, 2011). Contudo, o envolvimento da patogenicidade para a maioria desses agentes na doença ainda não foi estabelecido (REBEL *et al.*, 2006; ITO *et al.*, 2009). Além disso, tais agentes, por vezes são também isolados e identificados em aves saudáveis, sugerindo que, além da interação polimicrobiana, uma determinada combinação de fatores seja necessária para a manifestação da síndrome. Assim, alguns mecanismos subjacentes, que conduzem a síndrome como uma doença multifatorial devem ser levados em consideração (KIM, 2002).

2.9 Fatores não infecciosos envolvidos na SMA

Além dos agentes descritos anteriormente, uma ampla variedade de fatores não infecciosos são capazes de interferir no metabolismo, no desenvolvimento e na reparação do TGE. Desta forma, tais fatores podem contribuir para o desencadeamento de doença entérica nas aves (ITO *et al.*, 2009).

Diferentes situações relacionadas ao manejo são apontadas como possíveis desencadeadoras de estresse nas aves. Entre esses fatores, podem ser citados o espaço limitado, manejo inadequado, baixa qualidade do ar e a exposição a elevadas temperaturas (KIM, 2002; ITO *et al.*, 2009). Além disso, a baixa qualidade nutricional e a presença de micotoxinas na ração podem comprometer a geração de novas células e atuar como agentes imunossupressores, respectivamente (ITO, 2009).

Adicionalmente, fatores intrínsecos às aves tais como idade e características genéticas, podem predispor o hospedeiro a doença (KIM, 2002). As linhagens de aves

pesadas parecem ser mais suscetíveis aos efeitos da SMA do que outras. De igual forma, os machos reprodutores de alto rendimento (frangos de corte) aparentam ser mais severamente afetados do que as fêmeas (ZAVALA & BARBOSA, 2006; MARTINS & RESENDE, 2009).

2.10 Patogenia e sinais clínicos

O quadro clínico apresentado por aves acometidas pela SMA ocorre em razão da reduzida capacidade de absorção de nutrientes por parte dos enterócitos, seja pela ocorrência de lise e/ou degeneração celular. Da mesma forma, os sinais observados podem ser atribuídos pela diminuição dos microvilos ou retardo na formação destes (ITO *et al.*, 2009).

Como consequência desse quadro, o desenvolvimento da ave fica comprometido, especialmente nas duas primeiras semanas de vida, fase em que o processo de alongamento do intestino é fisiologicamente acelerado. Consequentemente, o requerimento energético e nutricional nesse período é fundamental para o crescimento e o desenvolvimento intestinal (COGBURN *et al.*, 2000). Por esta razão, quando ocorre algum problema nas primeiras semanas de vida da ave, dificilmente o desempenho do lote é recuperado, especialmente em frangos de corte, que possuem ciclo de vida de 42 dias (SMITH *et al.*, 2000; KIM, 2002; ITO, 2009).

Os principais sinais clínicos apresentados por aves com a SMA são a diarreia, reduzido ganho de peso, desenvolvimento deficiente e atrofia muscular, conforme mostra a Figura 5A (GUY, 1998; ITO *et al.*, 2009). O emplastamento de cloaca e a síndrome do trânsito rápido, em que há baixa digestibilidade do alimento e o aparecimento de ração não digerida nas fezes são achados comuns em aves acometidas (MARTINS & RESENDE, 2009).

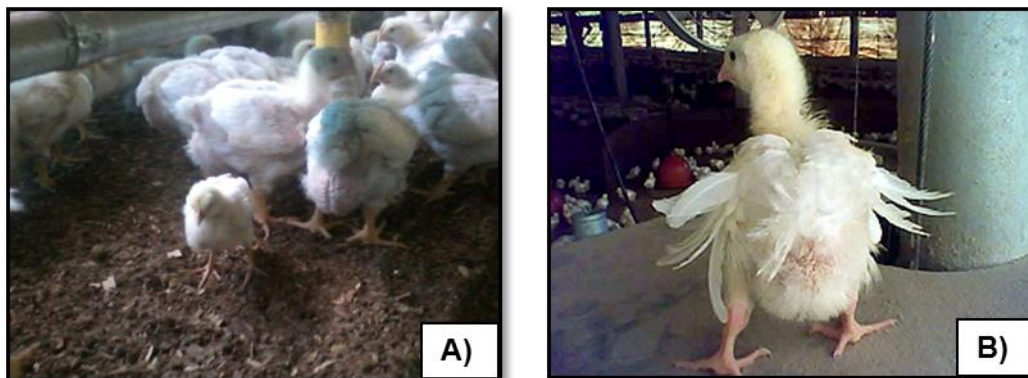


Figura 5 – Imagem de frango de corte com sinais clínicos sugestivos da SMA. A) Desenvolvimento desigual evidente entre aves do mesmo lote (19 dias de idade). Fonte própria. B) Ave com penas eriçadas, como se fossem as pás dos helicópteros (*helicopter disease*). Fonte: Patrício & Silva (2008).

Em decorrência da deficiência nutricional ocorrem problemas de empenamento, doenças relacionadas a osteoporose e outras anormalidades esqueléticas (REBEL *et al.*, 2006; MARTINS & RESENDE, 2009). Alterações observadas no empenamento, como penas eriçadas assemelhando-se às “pás dos helicópteros”, originam o termo síndrome do pinto helicóptero – *helicopter disease* (Figura 5B) (ZAVALA, 2006; PATRÍCIO, 2010; CARVALHO, 2012). O comprometimento da ontogenia de órgãos linfoides também pode acontecer, devido à carência nutricional. Este dano pode resultar em deficiências imunológicas e conseqüentemente em um aumento na suscetibilidade às doenças infecciosas (GUY, 1998; REBEL *et al.*, 2006; MARTINS & RESENDE, 2009; SAIF, 2013).

2.11 O ChPV na SMA

A infecção experimental com ChPV (ABU-P1) em pintos comerciais evidenciou que o vírus pode estar associado ao desenvolvimento da SMA (KISARY, 1985a; ZSAK, *et al.*, 2013). Nesses experimentos, os pesquisadores observaram que os frangos inoculados com o ChPV apresentaram uma redução de 40% no ganho de peso em comparação com aves controle (Figura 6A). Por outro lado, não houve qualquer efeito no ganho de peso em frangos SPF “*specific pathogen free*” inoculados com a mesma cepa (KISARY, 1985a; DECAESSTECKER *et al.*, 1986) sugerindo que o desenvolvimento da SMA esteja relacionado, entre outros fatores, a uma possível interação entre o ChPV e diferentes patógenos (KOUWENHOVEN *et al.*, 1983; MORAES & COSTA, 2012).

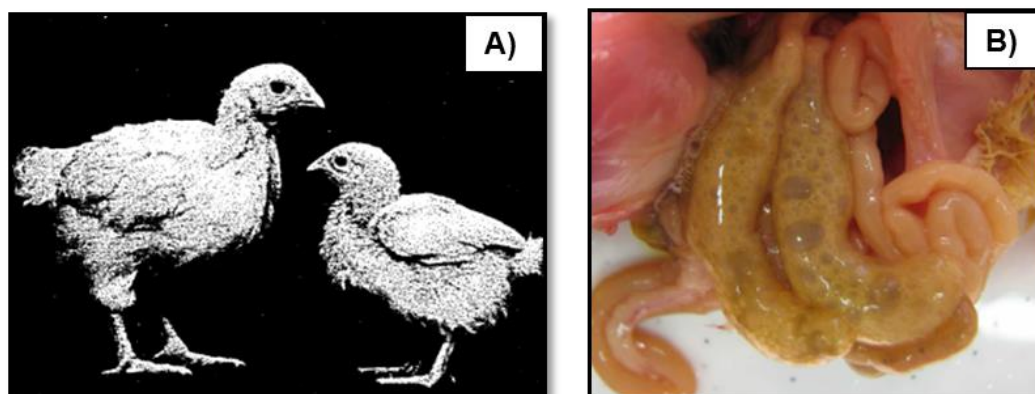


Figura 6 – Ilustração das alterações clínicas descritas na SMA em frangos. A) Frangos de quatro semanas de idade, não infectado (à esquerda) e infectados com ChPV (ABU) (à direita). Fonte: Kisary (1985a). B) Cecos com conteúdo amarelo-mostarda e com intensa presença de bolhas de gás. Fonte: Palade (2011).

Os sinais clínicos relatados após a inoculação de ChPV em aves, além do baixo desenvolvimento e conversão ineficiente de peso, são a presença de diarreia espumosa de cor amarelo-mostarda e distensão das alças intestinais pela presença de gases, especialmente em aves jovens (KISARY, 1985a; ZSAK *et al.*, 2013). A Figura 6B demonstra tais características evidenciadas em aves que apresentavam doença entérica e que a presença do ChPV foi confirmada (PALADE, 2011).

Outros estudos, de inoculação experimental em pintos de 1 dia de idade, demonstraram que, além do trato intestinal, os órgãos linfoides, em especial o baço e a bursa de Fabricius, podem albergar o genoma do ChPV até 35 dias após inoculação (ZSAK *et al.*, 2013). Embora a presença do genoma viral não signifique necessariamente a ocorrência da replicação viral ativa, é digno de nota que as células linfoides e das criptas intestinais apresentam elevada divisão mitótica, e a conseqüente replicação viral nesses tecidos pode induzir linfopenia e enterite, respectivamente (MORAES & COSTA, 2012).

2.12 Resposta imunológica

Infecções pelo parvovirus ativam tanto a resposta imune humoral como celular (BERNS & PARRISH, 2013). As infecções podem determinar a produção de anticorpos neutralizantes a partir da segunda semana após a infecção com produção de imunoglobulinas (Ig)M específica do vírus, com duração de uma semana, e sendo, em seguida, substituído por IgG (ANDERSON *et al.*, 1985; BEST & BLOOM, 2005). A

resposta imune humoral em aves inoculadas experimentalmente com ChPV é caracterizada pela produção de IgM, detectáveis entre 14 e 21 dias pós-inoculação (DPI), e IgG após 35 DPI (ZSAK *et al.*, 2013).

2.13 Morbidade e mortalidade

A morbidade e a mortalidade são variáveis, entretanto, o comprometimento do trato gastrointestinal resulta em lesões irreversíveis (ITO *et al.*, 2009). Nas formas mais graves, têm sido relatados a disfunção imune e o aumento da mortalidade das aves afetadas (PATRÍCIO, 2010). As perdas econômicas relacionadas às infecções dependem da severidade dos casos clínicos e da conduta adotada ao presenciar enfermidades no plantel. Em geral, o descarte causado pela refugagem aumenta em lotes com SMA, podendo variar entre 8 a 20% no plantel (MARTINS & RESENDE, 2009; CARVALHO, 2012).

2.14 Diagnóstico

O isolamento e a propagação do ChPV foram descritos com sucesso através da inoculação oral em pintos com uma solução filtrada e tratada com antimicrobianos, contendo partículas virais viáveis (KISARY *et al.*, 1984; REYNOLDS, 1998; ZSAK *et al.*, 2013). Entretanto, até o presente, não existe a descrição e o estabelecimento de um método eficaz de isolamento e propagação do ChPV *in vitro*, permanecendo a inoculação *in vivo* o procedimento mais propício para tal.

Outra forma de propagação viral consiste no cultivo do ChPV em ovos embrionados (KISARY *et al.*, 1984; KISARY, 1985a). As rotas de inoculação frequentemente utilizadas são a inoculação da membrana cório-alantoideano (CAM) e cavidade alantóica, a qual pode ser utilizada para o isolamento de diversos agentes (KISARY, 1985a; SENNE, 1998). A presença de um agente viral é evidenciada, na maioria dos casos, pelo desenvolvimento de lesões macro e microscópicas no embrião e/ou nas membranas vitelínicas (SANTOS, 2009; FLORES, 2012). No estudo descrito por Kisary (1985a), embriões de ovos SPF inoculados com ChPV apresentaram edema, hemorragias intensas e nanismo.

O diagnóstico para a detecção direta das partículas virais de ChPV pode ser realizado através da microscopia eletrônica (ME) de um material clínico, através da qual

é possível observar as características estruturais e morfológicas comuns aos parvovírus (KISARY *et al.*, 1984; RAYNOLDS, 1998; PALADE, 2011; FLORES, 2012). Além do método direto para detecção viral, técnicas de imunodiagnóstico visando o estudo e a mensuração entre antígeno-anticorpo foram descritos (KISARY, 1985b; ZSAK *et al.*, 2009; STROTHER & ZSAK, 2009; ZSAK *et al.*, 2013).

O exame histológico é considerado diagnóstico auxiliar, pois as lesões não são consideradas patognomônicas para a SMA (PAGE *et al.*, 1982; MCNULTY *et al.*, 1983; ITO *et al.*, 2009; MORAES & COSTA, 2012). No entanto, a presença de destruição do revestimento epitelial, o encurtamento da vilosidade associado a distensão luminal das criptas de *Lieberkühn*, tem sido considerado um dos parâmetros para o diagnóstico da SMA (ITO *et al.*, 2009).

O método mais utilizado para a detecção do genoma do ChPV é a reação em cadeia da polimerase convencional (PCR). A técnica de PCR em tempo real ou PCR quantitativa (qPCR), já foi descrita para a detecção e quantificação da carga viral do ChPV presente em fezes de aves (TARASIUK *et al.*, 2012; CARRATALÀ *et al.*, 2012). Porém, essa técnica parece ser pouco explorada para as investigações envolvendo o ChPV, dado o pequeno número de publicações realizadas até o momento. Além disso, uma abordagem investigativa entre a carga viral do ChPV presente em tecidos, soro e suabes de cloaca, de aves com a SMA e aves saudáveis ainda não foi descrita.

2.15 Profilaxia e tratamento

Em razão da falta do conhecimento e informações exatas sobre a etiologia da SMA, não existe tratamento específico ou vacinas comerciais disponíveis para as aves (ITO *et al.*, 2009; CARVALHO, 2012). Entretanto, existem estirpes vacinais recomendadas na avicultura comercial que visam a proteção contra o reovírus, o qual está entre os agentes descritos como causadores da enfermidade (MARTINS & RESENDE, 2009). Embora a terapia de suporte possa auxiliar na melhora clínica, o descarte de aves doentes torna-se a opção menos onerosa para o produtor. Cuidados com o bem-estar animal e programas eficientes de gerenciamento e biossegurança permanecem sendo importantes medidas preventivas contra a doença (CLARK & JONES, 2008; ITO *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Contribuir para um melhor conhecimento da biologia do ChPV, suas relações com os hospedeiros e seu papel como potencial agente patogênico em aves.

3.2 Objetivos específicos

- Pesquisar possíveis associações entre a presença do ChPV a ocorrência da SMA;
- Pesquisar a ocorrência e quantificar a carga genômica do ChPV em suabes de cloaca de frangos com sinais clínicos sugestivos da SMA e frangos saudáveis de diferentes granjas avícolas do Estado do Rio Grande do Sul;
- Investigar a ocorrência do ChPV em diferentes tecidos, intestino e soro de frangos de corte com sinais clínicos sugestivos da SMA e frangos saudáveis de diferentes granjas avícolas do Estado do Rio Grande do Sul;
- Averiguar a diferença de peso existente entre aves com sinais clínicos sugestivos de SMA e aves saudáveis;
- Comparar o desempenho das técnicas de PCR convencional e qPCR na detecção do genoma do ChPV.

4 ARTIGOS CIENTÍFICOS

A seguir serão apresentados, em capítulos, os artigos gerados a partir dos trabalhos realizados durante o mestrado. No primeiro capítulo desta dissertação é apresentado o desenvolvimento de uma técnica de PCR quantitativa (qPCR) para a detecção e quantificação de ChPV em amostras de suabes de cloaca de frangos de corte com sinais clínicos sugestivos de SMA e sadios. No segundo capítulo são apresentados estudos sobre a detecção do genoma do ChPV, por duas distintas técnicas de amplificação de ácidos nucléicos, em diferentes tecidos e soro de frangos de corte (sadios e com sinais clínicos sugestivos de SMA), bem como a quantificação de carga viral genômica do ChPV presente nessas amostras.

4.1 CAPÍTULO 01

Chicken parvovirus viral loads in cloacal swabs from malabsorption syndrome-affected and healthy broilers¹

¹ Artigo submetido à publicação no periódico *Veterinary Microbiology*.
Artigo formatado segundo normas do periódico.

Chicken parvovirus viral loads in cloacal swabs from malabsorption syndrome-affected and healthy broilers

Running title: ChPV and malabsorption syndrome

Fabrine Finkler^{1,2}, Diane Alves de Lima^{1,2}, Cristine Cerva^{1,2}, Samuel Paulo Cibulski^{1,2},
Thais Fumaco Teixeira^{1,2}, Helton Fernandes dos Santos^{1,2}, Laura Lopes de Almeida¹,
Paulo Michel Roehe^{1,2}, Ana Cláudia Franco^{2,§}

¹ FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone 55 51 34813711.

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Sarmiento Leite 500, sala 08, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone 55 51 33083655.

[§] Corresponding author: anafranco.ufrgs@gmail.com

Abstract

Chicken parvovirus (ChPV) has been associated with malabsorption syndrome (MAS) in broilers. However, the participation of this virus in such syndrome is unclear, since it may be detected in diseased and healthy chickens. In the course of these studies it was argued whether ChPV genome loads might be correlated to the occurrence of MAS. To check such a hypothesis, a SYBR Green-based quantitative polymerase chain reaction was developed to detect and quantify ChPV genomes. Cloacal swabs from 68 broilers with MAS and 59 from healthy animals were collected from different poultry farms. Genomes of ChPV were detected in all samples, regardless of their health status. However, viral genome loads in MAS-affected broilers were significantly higher (1×10^5 genome copies per 100 ng DNA) than in healthy animals (1.3×10^3 GC/100 ng DNA). These findings indicate that there is an association between high ChPV genome loads and the occurrence of MAS in broilers.

Keywords: Poultry, Parvovirus, runting-stunting syndrome (RSS), quantitative PCR (qPCR).

Introduction

Chicken parvovirus (ChPV) is a member of *Parvoviridae* family that belongs to the *Aveparvovirus* genus (Cotmore et al., 2014). Like other members of *Parvoviridae*, ChPV are small, spherical, non-enveloped particles with 18-26 nm in diameter, with icosahedral symmetry capsid without envelope. The ChPV genome consists of a single stranded linear DNA molecule, 5257 nucleotide (nt) long. It encodes two major proteins: the non-structural (NS) protein, essential for the replication of the viral genome, and a structural viral protein (VP) (Zsak et al., 2013). The NS gene appears to be highly conserved among parvoviruses, and it is often used as target for nucleic acid-based diagnostic tests (Zsak et al., 2009).

Parvoviruses are frequently associated with gastrointestinal disease in a wide range of animals and have been described in different species of birds (Chang et al., 2000; Shackelton et al., 2005). In poultry, it has been associated with malabsorption syndrome (MAS) – also called “physiological waste”, runting-stunting syndrome (RSS), helicopter disease, infectious stunting syndrome, or dirty cloacal syndrome and brittle bone disease (Day and Zsak, 2010; Guy, 1998; Kisary et al., 1984).

Despite the proposed association of ChPV and MAS, ChPV genomes have also been detected in healthy chickens (Domanska-Blicharz et al., 2012; Palade et al., 2011). Thus, any association between the presence of ChPV and MAS still remains unclear. In attempting to examine this question further, this work was conducted to investigate whether ChPV loads might bear any association with the occurrence of MAS. To achieve this goal, a quantitative, SYBR green based PCR (qPCR) was developed and applied to quantify ChPV genome loads in cloacal swabs of MAS-affected and healthy broilers.

Material and methods

Samples

One-hundred and twenty seven cloacal swabs (n=127) were collected from 19- to 39 days-old broilers in five different poultry farms in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. Sixty eight samples were from broilers presenting clinical signs suggestive of malabsorption syndrome (MAS): weight loss, low growth rate, apathy, prostration, pericloacal feathers smeared with feces and ruffled feathers. Additionally, 59 swab samples were randomly collected from apparently healthy broilers at the same age and from the same farms. The swabs were individually placed in sterile tubes containing 500 μ L of phosphate buffered saline (PBS), penicillin (2000 IU/mL) and streptomycin (2 mg/mL), and stored in cool boxes, shipped to the laboratory within 24 hours and stored at -80 °C until processing. This study was approved by the Ethics and Animal Experimentation Committee (CEUA) of FEPAGRO Saúde Animal – Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), project no. 04/14².

DNA extraction

Swabs were processed individually to reduce the likelihood of cross-contamination. Initially, the swabs eluted were homogenized by vortexing and clarified by centrifugation at 1,500 x g for 2 minutes. DNA was extracted from 200 μ L of the supernatants using a commercial kit Pure LinkTM Genomic DNA Mini kit (Invitrogen) according to the manufacturers' instructions. The quantity and quality of the DNA were determined in a spectrophotometer (Nanodrop[®] 1000). One-hundred ng of total extracted DNA was used for qPCR. To determine the integrity and quality of DNA extracted, all samples were subjected to amplification of the 16S ribosomal bacterial

² A cópia do parecer favorável à pesquisa concedido pelo CEUA – IPVDF está disponível no anexo A desta dissertação.

gene (FC27: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' and R530: 5'-CCGCGGCTGCTGGCACGTA-3'), according to Gontang *et al.* (Gontang et al., 2007).

Standard curve and determination of qPCR sensitivity and reproducibility

To build a standard curve for qPCR, a conventional PCR was performed to clone a gene segment of 561 bp within the ChPV NS gene (Zsak et al., 2009). The PCR amplicon so obtained was purified using Quick Gel Extraction Kit Combo and PCR Purification (Invitrogen) and cloned into plasmid pCR2.1 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the nucleotide sequence of the plasmid with the inserted DNA was determined by a 3130 Genetic Analyzer, with the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). The sequence of the cloned insert was confirmed using the BLASTN program. Recombinant plasmid DNA was quantified in a spectrophotometer (Qubit, Invitrogen) and tenfold dilutions were prepared to determine sensitivity and amplification efficiency (Eff) of the qPCR. To evaluate the reproducibility of the qPCR, three independent experiments were performed and the standard curve was determined in triplicate in each plate. Samples were run in triplicate to reduce risk of false positive or false negative results associated to technical errors.

Quantitative PCR (qPCR)

Primers for the qPCR were designed based on the ChPV NS gene using the software Geneious (version 5.4) (PF: 5'-CCGAATTTAACGGGACTTTGC-3') and (PR: 5'-TGGTTAACACAATCGGCACA-3'), for an expected amplicon size of 67 bp. These were designed to amplify a 67 bp fragment located within the cloned segment of the NS gene (561 bp). Samples and standard curve were run in triplicate; negative

controls were prepared with the same reagents used above, except that the sample DNA was replaced by sterile water. The reactions were performed in a final volume of 12.5 μL containing 3 μL of extracted DNA (or DNA from the recombinant plasmid for generating the standard curve), 6.25 μL of 2X Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen) and 250 nM of each primer. Reactions were carried out in 48-well plates in a StepOne™ Real-Time PCR System (Life Technologies) under the following cycling conditions: 2 min at 50 °C, 2 min at 95 °C and 40 cycles of amplification (95 °C for 15s and 60 °C for 30s). A dissociation curve (melting) was performed by a gradual increase in temperature (0.3 °C) from 60 °C to 95 °C. The number of copies of viral DNA was determined by comparison with the standard curve.

Statistical analysis

Descriptive statistics and a nonparametric Mann-Whitney test were performed using the GraphPad Prism5 software. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

Analysis of the ChPV qPCR performance

The sensitivity of the ChPV qPCR was evaluated using a plasmid carrying a ChPV genome fragment. The assay was able to detect a minimum of 10 genome copies (GC) per reaction (Figure 1A). The average linear correlation (R^2) was 0.999 ± 0.03 and the average amplification efficiency (Eff %) of the qPCR on plasmid DNA containing the targeted segment was 99.3 ± 2.1 . The dissociation curve (melting) of the amplification products was 77.4 °C and gave rise to a single peak, confirming the specificity of the assay (Figure 1B).

The 16S fragment gene was amplified in all samples, confirming the integrity and quality of the extracted DNA. Standard curve inter- and intra-assay precision ranged between 0.01% to a maximum of 1.0%.

Detection and quantification of ChPV

Chicken parvovirus genomes were detected in all cloacal swab samples examined, including in both MAS-affected and healthy broiler samples. However, quantitative analysis showed significant differences in genome loads when comparing MAS-affected with healthy animals. MAS-affected broilers had, on average, 1×10^5 (SD $\pm 2.6 \times 10^5$) ChPV genome copies (GCs) per 100 ng DNA, whereas healthy broilers had average GC numbers around $1.3 \times 10^3/100$ ng DNA (SD $\pm 2.7 \times 10^3$) (Figure 2). The difference in genome loads between MAS-affected and healthy broilers was highly significant ($p \leq 0.0001$).

Discussion

A role for ChPV in the etiology of MAS was proposed in 1984, when parvovirus-like virus particles were identified in the intestines of MAS-affected chickens (Kisary et al., 1984). Experimental infections with ChPV in embryonated eggs and one day old broiler chickens was capable of inducing decreased egg hatchability, enteritis and low vitality (Kisary, 1985); in two days old chickens, ChPV was believed to be capable of causing MAS (Zsak et al., 2013). However, others observed that ChPV infection had no effect on weight gain on "*specific pathogen free*" chicks (Decaesstecker et al., 1986; Kisary, 1985), suggesting the existence of possible interactions with different pathogens in the occurrence of MAS.

In the present study, it was aimed to investigate the role for ChPV in MAS by using a quantitative approach. Detection of ChPV genomes by conventional PCR has already been reported by some authors (Koo et al., 2013; Zsak et al., 2009). However, a few studies focused on the quantification of ChPV genomes (Carratala et al., 2012; Tarasiuk et al., 2012). Here, an effort was made to associate a quantitative tool to examine the occurrence of ChPV in MAS- affected as well as in healthy broilers, by examining samples of cloacal swabs. To achieve that aim, a SYBR Green-based qPCR was developed to detect and quantify ChPV genomes. This *in house* qPCR allowed the detection of ChPV genomes with high sensitivity (up to 10 GC/reaction) and efficiency ($99.3\% \pm 2.1$). The melting curve of the amplification gave rise to a single peak, confirming the specificity of the assay. Thus, the qPCR developed here proved to be an adequate tool for detection and quantification of ChPV.

The frequency of ChPV genome detection did not vary among the two groups of broilers examined (MAS-affected and healthy). All of the samples (total n=127) contained ChPV genomes, indicating a wide distribution of the agent. The frequencies detected in this study are higher than those reported by Zsak and others authors (Zsak et al., 2009). However, those authors used a conventional PCR whose sensitivity was around 100-500 molecules of ChPV genomes per reaction. Here, the high frequency of detection of ChPV genomes might be consequent to the high sensitivity of the qPCR employed in the analyses.

The detection of ChPV DNA in both MAS-affected and healthy broilers is consistent with previous works (Domanska-Blicharz et al., 2012; Palade et al., 2011). However, a significant difference in viral genome loads was evident between diseased and healthy groups of birds ($p < 0.0001$), suggesting a possible correlation between high ChPV loads and occurrence of MAS. In MAS-affected broilers, ChPV viral were up to

2 \log_{10} higher than in healthy animals. Thus, despite the apparent widespread distribution of ChPV infection, where all birds sampled - regardless of their disease status – were indeed infected, quantification of ChPV genomes may become useful as an aid to the diagnosis of MAS.

This is the first report comparing ChPV genome loads in cloacal swabs of MAS-affected and healthy broilers. Infections with ChPV are apparently widespread and its frequency of detection seems not to be associated to the occurrence of MAS. However, viral genome loads in cloacal swabs from MAS-affected broilers were significantly higher than in those of healthy broilers. These results suggest that the virus may have a role in MAS, whose nature must be subject for further studies.

Acknowledgements

This work was partially supported by the CNPq, FINEP and CAPES; Fabrine Finkler has been supported by a CNPq Master Degree studentship. Ana Cláudia Franco is a CNPq 2 research fellow.

References

- Carratala, A., Rusinol, M., Hundesa, A., Biarnes, M., Rodriguez-Manzano, J., Vantarakis, A., Kern, A., Sunen, E., Girones, R., Bofill-Mas, S., 2012. A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. *Applied and environmental microbiology*78, 7496-7499.
- Chang, P.C., Shien, J.H., Wang, M.S., Shieh, H.K., 2000. Phylogenetic analysis of parvoviruses isolated in Taiwan from ducks and geese. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*29, 45-49.
- Cotmore, S.F., Agbandje-McKenna, M., Chiorini, J.A., Mukha, D.V., Pintel, D.J., Qiu, J., Soderlund-Venermo, M., Tattersall, P., Tijssen, P., Gatherer, D., Davison, A.J., 2014. The family Parvoviridae. *Archives of virology*159, 1239-1247.
- Day, J.M., Zsak, L., 2010. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. *Virology*399, 59-64.
- Decaesstecker, M., Charlier, G., Meulemans, G., 1986. Significance of parvoviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*15, 769-782.
- Domanska-Blicharz, K., Jacukowicz, A., Lisowska, A., Minta, Z., 2012. Genetic characterization of parvoviruses circulating in turkey and chicken flocks in Poland. *Archives of virology*157, 2425-2430.
- Gontang, E.A., Fenical, W., Jensen, P.R., 2007. Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Applied and environmental microbiology*73, 3272-3282.
- Guy, J.S., 1998. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. *Poultry science*77, 1166-1175.
- Kisary, J., 1985. Experimental infection of chicken embryos and day-old chickens with parvovirus of chicken origin. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*14, 1-7.
- Kisary, J., Nagy, B., Bitay, Z., 1984. Presence of parvoviruses in the intestine of chickens showing stunting syndrome. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*13, 339-343.
- Koo, B.S., Lee, H.R., Jeon, E.O., Han, M.S., Min, K.C., Lee, S.B., Mo, I.P., 2013. Molecular survey of enteric viruses in commercial chicken farms in Korea with a history of enteritis. *Poultry science*92, 2876-2885.
- Palade, E.A., Kisary, J., Benyeda, Z., Mandoki, M., Balka, G., Jakab, C., Vegh, B., Demeter, Z., Rusvai, M., 2011. Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A*40, 191-197.
- Shackelton, L.A., Parrish, C.R., Truyen, U., Holmes, E.C., 2005. High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*102, 379-384.
- Tarasiuk, K., Wozniakowski, G., Samorek-Salamonowicz, E., 2012. Occurrence of chicken parvovirus infection in Poland. *The open virology journal*6, 7-11.
- Zsak, L., Cha, R.M., Day, J.M., 2013. Chicken parvovirus-induced runting-stunting syndrome in young broilers. *Avian diseases*57, 123-127.
- Zsak, L., Strother, K.O., Day, J.M., 2009. Development of a polymerase chain reaction procedure for detection of chicken and turkey parvoviruses. *Avian diseases*53, 83-88.

Figure captions

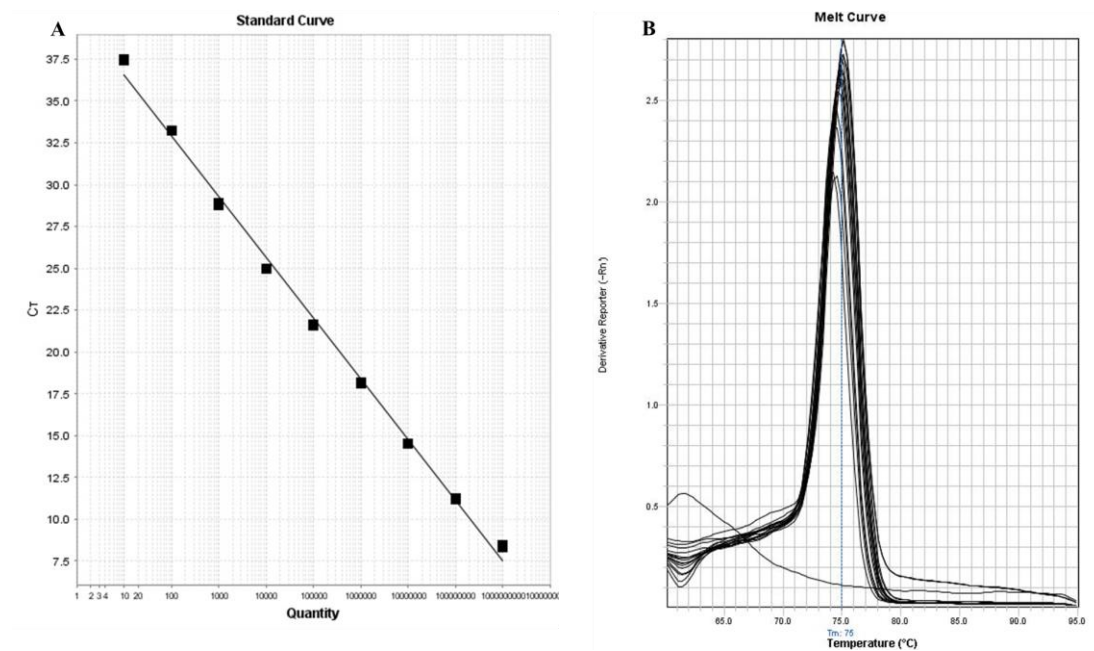


Figure 1. SYBR Green quantitative PCR for detection of chicken parvovirus (ChPV) genomes. A) Standard curve constructed with basis on the amount of ChPV DNA copies versus the threshold cycle (Ct) obtained at the SYBR Green real-time polymerase chain reaction (SYBR Green qPCR). Tenfold dilutions (10^8 at 10^1) of a plasmid containing a cloned segment of the ChPV gene NS were used as templates for construction of the curve. The amounts of ChPV molecules are given on a \log_{10} scale. B) Dissociation curves of the SYBR Green qPCR from ChPV genomes identified in samples of cloacal swabs.

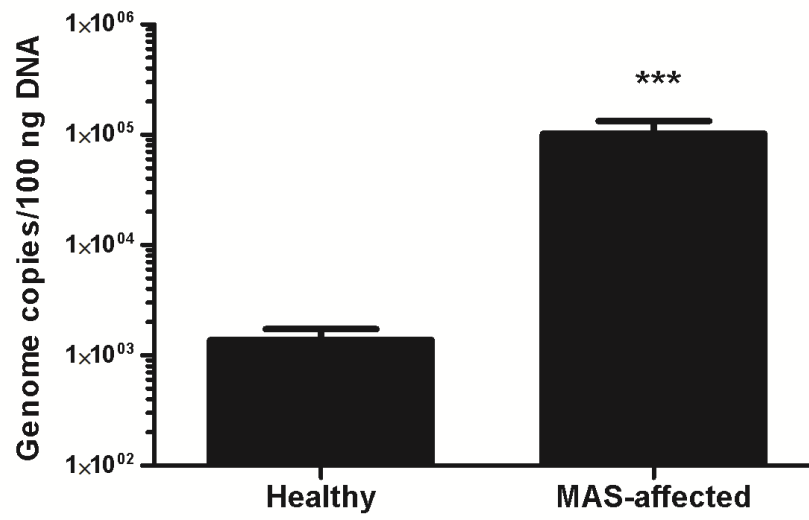


Figure 2. ChPV viral loads detected in cloacal swabs from healthy and MAS-affected broilers. Asterisks indicate significance ($p \leq 0.0001$).

4.2 CAPÍTULO 02

Malabsorption syndrome-affected chickens exhibit higher *Chicken parvovirus* loads than healthy chicken³

³ Artigo a ser submetido à publicação no periódico Avian diseases.

Malabsorption syndrome-affected chickens exhibit higher *Chicken parvovirus* loads than healthy chicken

Fabrine Finkler^{1,2}, Diane Alves Lima^{1,2}, Cristine Cerva^{1,2}, Lucas Brunelli de Moraes¹, Samuel Paulo Cibulski^{1,2}, Thais Fumaco Teixeira^{1,2}, Helton Fernandes dos Santos^{1,2}, Laura Lopes de Almeida¹, Paulo Michel Roehe^{1,2}; Ana Cláudia Franco^{2,§}

¹FEPAGRO Saúde Animal - Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde 6000, Eldorado do Sul, CEP 92990-000, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone 55 51 34813711.

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Av. Sarmiento Leite 500, sala 08, Porto Alegre, CEP 90050-170, Rio Grande do Sul, Brazil. Phone 55 51 33083655.

§ Corresponding author: anafranco.ufrgs@gmail.com

Abstract

Chicken parvovirus (ChPV) have been studied as a possible agent involved in the malabsorption syndrome (MAS) in chickens. However, the role of ChPV in the development of MAS has not been elucidated since the virus genome may be present both in healthy and MAS-affected chickens. This study aimed to detect and quantify the ChPV loads present in tissues (liver, thymus, spleen, bursa of Fabricius-BF and gut) and serum from 50 MAS-affected and 9 healthy commercial broilers. These 39 days-old broilers were weighed, euthanized and submitted to a search for macroscopic lesions. Healthy broilers had an average weight of 2.44 kg, and MAS-affected, 1.45 kg - 40% less than healthy chickens. This weight difference between the groups was significant ($p \leq 0.0001$). Conventional and quantitative PCR were performed using DNA extracted from tissues and serum in order to detect and quantify ChPV DNA. Both techniques were able to detect the ChPV genome in healthy and MAS-affected broilers, but viral genome loads in MAS-affected broilers were significantly higher than in healthy broilers. Among MAS-affected broilers, the intestines showed the highest loads of ChPV DNA (~5,500 copies/300ng DNA), followed by BF (~1,134 copies), spleen (~276 copies), thymus (~12 copies), liver samples (~33 copies). The average viral load in serum was 1.134 copies/mL. No viral DNA was found in sera and thymus from healthy animals. Livers of healthy animals showed significantly lower concentrations of viral DNA (~10 copies/300ng DNA) in comparison to their spleens (~135 copies), intestines (~296 copies) and BFs (~358 copies). The qPCR used in this study showed, for the first time, that tissues of MAS-affected broilers had higher viral loads than those collected from healthy broiler.

Keywords: Poultry. *Parvoviridae*. Runting-stunting syndrome (RSS). Conventional PCR. Quantitative PCR (qPCR).

Introduction

Chicken parvovirus (ChPV) belongs to the genus *Aveparvovirus*, subfamily *Parvovirinae* (BERNS & PARRISH, 2013; COTMORE *et al.*, 2014). The ChPV was first described in 1984 when viral particles were observed by electronic microscopy and isolated from diseased chickens (KISARY *et al.*, 1984). The ChPV has a single-stranded DNA genome with 5257 nucleotides (nt) in length. It encodes two proteins: the non-structural protein (NS), conserved within the parvoviruses and essential for the replication of the viral genome and the protein that constitutes the viral capsid (VP) (DAY & ZSAK, 2010).

The malabsorption syndrome (MAS), also known as runting-stunting syndrome (RSS) and helicopter disease, causes economic losses to the poultry industry and delay in growth and development of broilers. Numerous microorganisms are considered suspects in the etiology of MAS, including bacteria and viruses (GUY, 1998; REBEL *et al.*, 2006; SAIF, 2013). However the involvement of ChPV in MAS is controversial, since DNA is detected in both healthy chickens and in chickens with enteric diseases (PALADE *et al.*, 2011; DOMANSKA-BLICHAZ *et al.*, 2012).

Conventional PCR analysis was shown to be efficient for detecting ChPV genome in different tissues of broilers (ZSAK *et al.*, 2013). However, measurement of viral genome load in MAS-affected and a healthy chicken has not been reported. In order to assess the pathogenic role of ChPV in the occurrence of MAS in chickens, this study aims to investigate the presence and amount of ChPV in different tissues and serum of healthy and MAS-affected broilers, as well as to compare the efficiency molecular techniques used for DNA ChPV detection.

Material and Methods

Animal samples

The study was conducted at the Virology Laboratory of the Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Rio Grande do Sul state, Brazil. All animal experiments were approved by the Ethical Committee of the IPVDF (n° 04/2014)⁴.

Tissues (liver, thymus, spleen, bursa of Fabricius-BF and whole gut) and serum from 59 commercial chicken broilers (39 days of age) were collected from four different poultry farms of Rio Grande do Sul state. Fifty animals, namely MAS-affected broilers, presented clinical signs suggesting malabsorption syndrome (MAS) (weight loss, low growth rate, apathy, prostration, pericloacals feathers smeared with feces and ruffled feathers). Additionally, samples from 9 animals apparently healthy were collected. After the euthanasia the broilers were individually weighed, submitted to necropsy and the tissues were collected, stored in cool boxes and sent to the laboratory.

DNA extraction

DNA from fragments of liver, thymus, spleen and BF was extracted individually, and the different portions of intestine (duodenum, jejunum and ileum) from each animal were pooled for DNA extraction. The DNA extraction from tissues was performed according to Teixeira *et al.* (2013) and from serum was performed using phenol:chloroform protocol (SAMBROOK & RUSSELL, 2001). Sera samples from MAS-affected group were grouped two by two samples (25 pooled-sera samples).

The amount and quality of extracted DNA was determined using a spectrophotometer (L-Quant, Loccus Biotecnologia). Integrity and quality of DNA were

⁴ A cópia do parecer favorável à pesquisa concedido pelo CEUA – IPVDF está disponível no anexo A desta dissertação.

tested by amplification of the constitutive β -actin gene of *Gallus gallus* as previously described (SILVA *et al.*, 2009).

Conventional PCR - ChPV detection and sensitivity of the assay

Conventional PCR was performed using the primers described by Zsak *et al.* (2009). Briefly, reactions were prepared in a final volume of 25 μ L containing 300 ng total DNA, 2 mM MgCl₂, 2.5 μ l of 10x PCR buffer (Invitrogen), 5 pM of each primer, 1.25 U of *Taq* DNA polymerase, 2.5mM of dNTPs. Negative controls (DNA from SPF chickens) were run in every set of eight DNA samples to ensure the PCR mix was not contaminated. Reactions were performed in a *Veriti Thermal Cycler*[®]- Applied Biosystems under the following conditions: 5 min at 94 °C; 35 cycles of 94 °C for 1 min, 61 °C for 30 sec and 72 °C for 1 min; followed by a final extension of 7 min at 72 °C. The amplicons (561 bp) were visualized by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide.

A positive control used was the ChPV amplicon cloned into a pCR2.1 vector (Invitrogen) according to the manufacturer recommendations. The concentration of plasmid DNA was evaluated fluorometrically (Qubit, Invitrogen) and diluted in a tenfold series to determine the analytic sensitivity of the assay.

Quantitative PCR - ChPV detection and sensitivity of the assay

A qPCR was performed using primers based on the ChPV-NS (PF: 5'-CCGAATTTAACGGGACTTTGC-3') and (PR: 5'-TGGTTAACACAATCGGCACA-3'), for an expected amplicon size of 67 bp. Reactions were prepared in a final volume of 12.5 μ L containing 3 μ L of sample DNA (300 ng) or standard plasmid (to generate

the standard curve), 6.25 µL of 2X Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen) and 250 nM each of forward and reverse primers.

The assay was performed according to Finkler *et al.* 2015 (*in submission*). Amplification and quantification were performed using Step One™ Real-Time PCR System (Life Technologies) under the following conditions: 2 min at 50 °C, 2 min at 95 °C followed by 40 cycles of amplification (95 °C for 15s and 60 °C for 30s). A dissociation curve was performed by a gradual increase of temperature (0.3 °C) from 60 °C to 95 °C. The number of copies of viral DNA genome of the samples was determined for the comparison with a standard curve.

Statistical analysis

Descriptive non nonparametric Mann Whitney statistical analysis and Kruskal-Wallis analysis (with Dunn's post-test) were performed using the Graph Pad Prism5 software. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

Results

Clinical signs, animal weight and macroscopic lesions at necropsy

Healthy broilers weighed on average 2.44 kg, while the MAS-affected broilers weighed 1.45 kg, on average – 40% less than healthy ones. The statistical analysis indicated a significant difference ($p \leq 0.0001$) between the mean weights of both groups (Figure 1).

No macroscopic lesion was observed during necropsy of healthy broilers. Additionally, the ante-mortem examination did not reveal clinical signs in these birds. MAS-affected broilers, in turn, presented weight loss, low growth, apathy, prostration, pericloacals feathers smeared with feces and ruffled feathers. Still, peritonitis,

perihepatitis and pericarditis were observed in 4% (2/50) of MAS-affected broilers in post-mortem examination. In addition 16% of diseased broilers had intestinal contents filled by diarrhea or gas-distended intestines.

Detection of ChPV by conventional PCR and qPCR

The sensitivity of the conventional PCR was determined by titrating tenfold dilutions of known quantities of plasmid harboring the ChPV genome fragment. The conventional PCR was able to detect a minimum of 100 molecules of ChPV per reaction. The qPCR sensitivity was determined to detect approximately 10 copies / reaction (Finkler *et al.* 2015, *in submission*). All samples analyzed were positive to the housekeeping gene β -actin, confirming the integrity and quality of the extracted DNA.

Both PCRs detected ChPV genome in 100% of the broilers analyzed (animals were considered positive when at least one of tissues was positive), independently of the group investigated (healthy and MAS-affected). All the samples that resulted positive in the conventional PCR were also positive when the qPCR was applied (data not shown). However, qPCR was able to detect ChPV DNA in 7 additional samples. ChPV DNA was most frequent in the bursa of Fabricius (100%; 59/59), followed by spleen (96.6%; 57/59), intestine (93.2%; 55/59), liver (23.7%; 14/59), thymus (3.4%; 2/59) and serum (29.4%; 10/34). The ChPV genome distribution in different organs of healthy and MAS-affected broilers is shown in Table 1.

Quantification of ChPV

Comparing the two groups of broilers, ChPV viral loads were significantly higher in BF ($p \leq 0.0001$), spleen ($p \leq 0.001$), intestine ($p \leq 0.05$), liver ($p \leq 0.05$) and serum ($p \leq 0.001$) of MAS-affected broilers, as shown in Figure 2.

Among the MAS-affected broilers, the intestines displayed the highest loads of ChPV DNA (~5,500 copies/300ng DNA). Viral loads found in the BF (~1,134 copies/300ng DNA) and spleen (~276 copies/300ng DNA) varied but this difference was not significant ($p>0.05$) when compared with intestine samples. Viral DNA was found in thymus tissue of two of the 50 animals (4%), with a low viral load (~12 copies/300ng DNA). Liver samples had lower viral loads (~33 copies/300ng DNA) compared to the viral loads found in the intestine, BF and spleen ($p\leq 0.0001$). ChPV DNA was detected on average 1.134 copies/mL in serum from MAS-affected broilers.

Among the healthy broilers, the BFs displayed the highest loads of ChPV DNA (~358 copies/300ng DNA). Lower viral loads were found in intestines (~296 copies/300ng DNA), spleens (~135 copies/300ng DNA) and livers (~10 copies/300ng DNA), when compared to, and no viral DNA was found in sera and thymus of healthy animals.

Discussion

The malabsorption syndrome (MAS), characterized by a low growth rate of the broilers, causes significant economic losses to poultry industry. In this study it was observed that the 39-days-old broilers with clinical signs of MAS analyzed weighed 40% (1.45 kg on average) less than healthy broilers (2.44 kg on average) at same age. This weight difference between healthy and diseased animals evidences the impact of MAS on productivity and economy, since these birds were in pre-slaughter age.

Various enteric viruses have been reported as potentially etiological agents of MAS in chickens. There are few data regarding the definitive correlation between ChPV presence and development of MAS in broilers and chickens, and a clear correlation between ChPV and disease remains undefined, as viral DNA may be identified in

tissues of both healthy and diseased broilers. So, the aim of this study was to detect and quantify ChPV DNA in tissues of healthy and MAS-affected broilers in order to verify the differences in viral load. Our results show that viral DNA is widely found in broiler tissues. However, viral loads in tissues from healthy animals are significantly lower than those found in tissues from MAS-affected animals. Both the conventional and quantitative PCR were effective in detecting ChPV genomes. However, the qPCR was more sensitive, being able to detect 10 genomic copies/reaction whereas the conventional PCR detected 100 genomic copies/reaction.

In this study we detected ChPV genome in all the sampled animals (healthy and MAS-affected) by both conventional and qPCR. These findings are consistent with a previous study performed in Hungary, when the ChPV genome was present in 100% (15/15) of broiler flocks displaying enteric disease and in 15% (2/13) of flocks of healthy broilers (PALADE *et al.*, 2011). On the other hand, in Brazil, ChPV was not detected in healthy birds (0/68), while ChPV genome was found in 12.1% of birds with enteric disease (METTIFOGO *et al.*, 2014). The higher frequencies of ChPV in both healthy and diseased broilers found in this work could be explained by the high sensitivity of the PCRs developed in this work. However, this sensitivity cannot be compared to those previous works, since this data is not available.

Significant differences were observed when comparing the viral loads found in tissues of healthy and MAS-affected broilers. The ChPV viral loads in different tissues (BF, spleen, intestine, liver and serum) were significantly higher in MAS-affected animals than in healthy broilers. In addition, viral DNA was not detected in the thymus tissues of healthy broilers, while it was found in 2 out of the 50 MAS-affected broilers only by qPCR. In a study involving experimental ChPV infection of 2 days-old chicks, viral DNA was not detected in thymus tissues by a conventional PCR when the birds

had 35 day-old (ZSAK *et al.*, 2013). These findings can be associated efficiency qPCR developed here.

This is the first report that assesses ChPV viral load in samples from healthy and MAS-affected broilers. Among all tissues analyzed, the intestines of the MAS-affected broilers displayed the highest viral loads (~5,500 copies/300ng DNA). These data is in agreement with the suggestion that the primary target cells of ChPV are located in the intestinal tract (ZSAK *et al.*, 2013). This finding is not surprising since other species of parvoviruses preferentially grow in fast-dividing cells (BERN & PARRISH, 2013).

In summary, ChPV DNA was broadly distributed in the sampled tissues analyzed here. Tissues obtained from MAS-affected broilers contained higher viral loads compared to healthy chickens. To your knowledge, these results are shown for the first time and suggest that the presence of high ChPV loads may be associated with the development of MAS. However further investigations are needed to elucidate the factors involved in the dynamics of this syndrome.

Acknowledgments

This work was partially supported by the CNPq, FINEP and CAPES; FF has been supported by a CNPq Master Degree studentship. ACF is a CNPq 2 research fellow and PMR is a CNPq 1A research fellow.

References

- BERNS, K. I.; PARRISH, C. R. Parvoviridae. In: KNIPE, D. M. *et al.* **Fields – Virology**, 6th Ed., v. 2, p. 1768-1791, 2013.
- COTMORE, S. F. *et al.* The family *Parvoviridae*. **Archives of Virology**, v. 159, p. 1239–1247, 2014.

DAY, M. J.; ZSAK, L. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. **Virology**, 399, 59–64, 2010.

DOMANSKA-BLICHAZ, K. *et al.* Genetic characterization of parvovirus circulating in turkey and chicken flocks in Poland, **Archives of Virology**, v. 157, p. 2425-2430, 2012.

FINKLER, F. *et al.* (*in submission*) **Chicken parvovirus viral loads in cloacal swabs from malabsorption syndrome-affected and healthy broilers.** Detecção e quantificação do genoma de Parvovirus de galinha (ChPV) em frangos de corte saudáveis e com síndrome da má absorção. Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, 2015.

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

KISARY, J. *et al.* Presence of Parvoviruses in the Intestine of chickens Showing Stunting Syndrome. **Avian Pathology**, v. 13, p.339-343, 1984.

KISARY, J., *et al.* Presence of Parvoviruses in the Intestine of chickens Showing Stunting Syndrome. **Avian Pathology**, v. 13, p. 339-343, 1984.

METTIFOGO, E. *et al.* Emergence of Enteric Viruses in Production Chickens Is a Concern for Avian Health. **Scientific Journal Hindawi**, v. 2014, Article ID450423, 8 pg, 2014.

PALADE, E. A. *et al.* Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 191-197, 2011.

REBEL, J. M. J. *et al.* Malabsorption syndrome in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, p. 17-29, 2006.

SAIF, Y.M. Viral enteric infections. In: Glisson *et al.* **Diseases of Poultry**, Publishing, Ames, Iowa, EUA. 13th ed., p. 329-330, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SILVA, S. E. L. da; *et al.* Epidemiological aspects of *Astrovirus* and *Coronavirus* in poult in the south eastern region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 248-253, 2009.

TEIXEIRA, T. F. *et al.* Torque tenosus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of postweaning multisystemic wasting syndrome. **Virus Genes**, v. 47, p. 276–281, 2013.

ZSAK, L., *et al.* Chicken Parvovirus–Induced Runting–Stunting Syndrome in Young Broilers. **Avian Diseases**, v.57, p. 123–127, 2013.

ZSAK, L., *et al.* Development of a Polymerase Chain Reaction Procedure for Detection of Chicken and Turkey Parvoviruses. **Avian Diseases**, v. 53, n. 1, p. 83-88, 2009.

Table 1. Frequency of detection of ChPV in five different tissue samples and serum from healthy and MAS-affected broilers by qPCR.

	Liver	Thymus	Spleen	BF	Intestine	Serum
	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
MAS-affected	24 (12/50)	4 (2/50)	96 (48/50)	100 (50/50)	92 (46/50)	40 (10/25)
Healthy	22.2 (2/9)	0 (0/9)	100 (9/9)	100 (9/9)	100 (9/9)	0 (0/9)
Total	23.7 (14/59)	3.4 (2/59)	96.6 (57/59)	100 (59/59)	93.2 (55/59)	29.4 (10/34)

% of positive samples (number of positive samples/total samples tested).

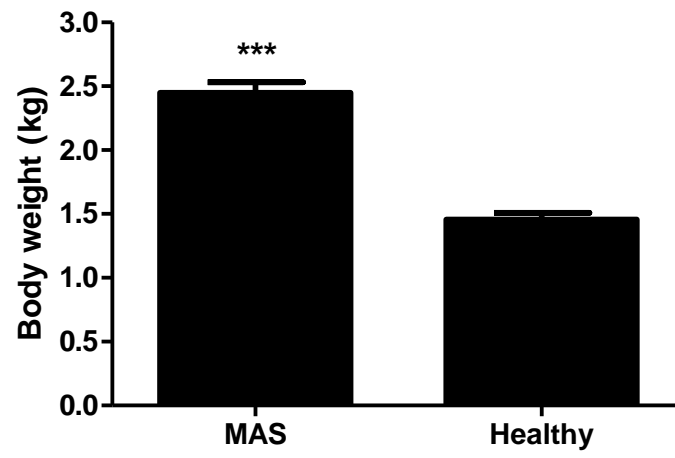


Figure 1. Analysis of the weight of healthy and MAS-affected chickens.***, $p \leq 0.0001$.

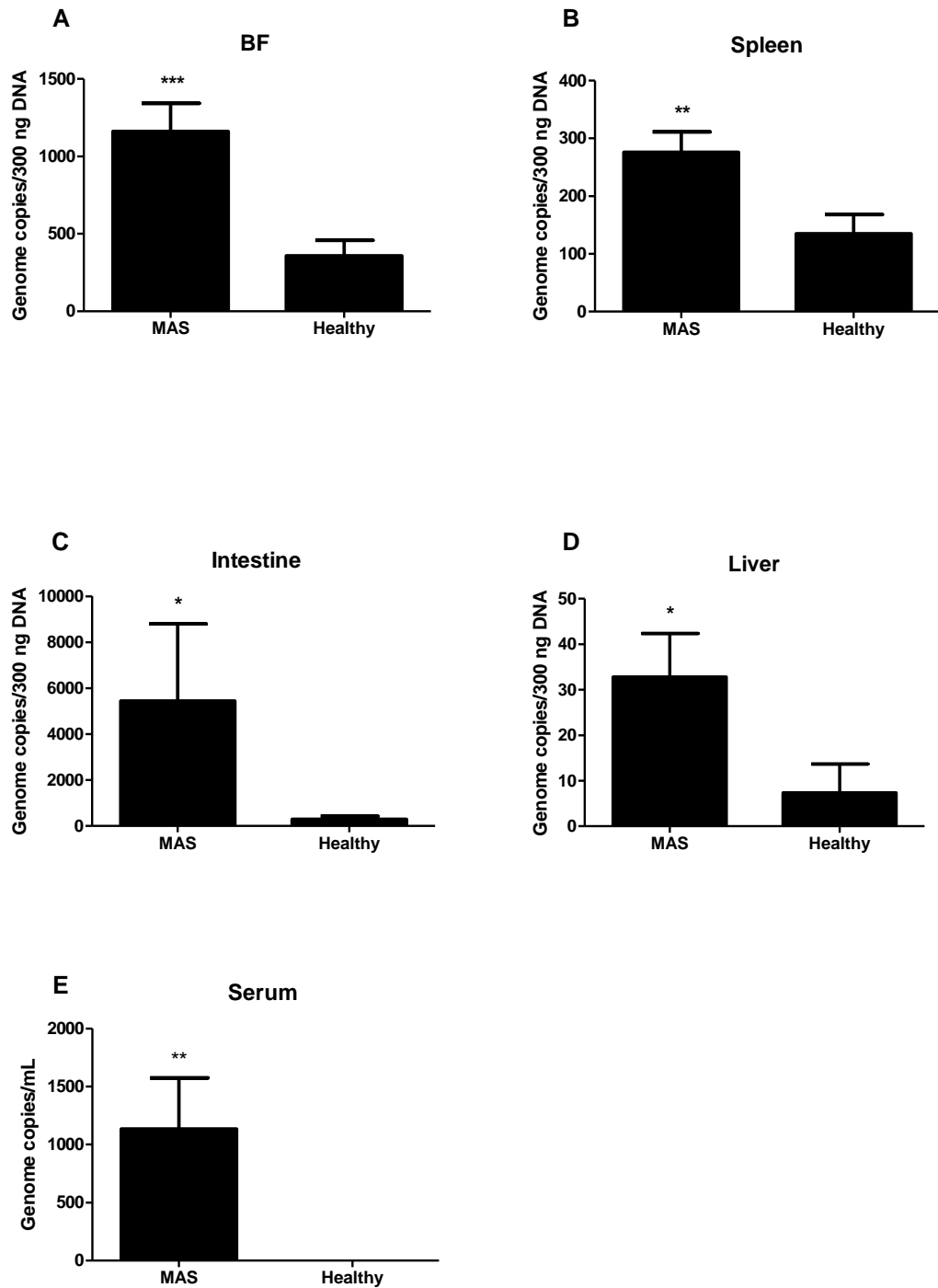


Figure 2. Mean quantification of the ChPV (expressed as copy number/300 ng of DNA) obtained by absolute qPCR from BF (A), spleen (B), intestine (C) liver (D) and serum samples (E). The graphics represent mean values and standard deviation. *, $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.001$; *** $p \leq 0.0001$.

5 DISCUSSÃO GERAL

A síndrome da má absorção (SMA) em frangos é uma doença multifatorial e possivelmente polimicrobiana que tem sido relacionada a elevados prejuízos para a avicultura. Embora a infecção pelo parvovirus de galinha (ChPV) tenha sido relacionada ao desenvolvimento da SMA, não há dados experimentais que comprovem essa associação. Este trabalho foi realizado com o propósito de elucidar a possível associação entre a presença do ChPV e a ocorrência da SMA. Para isso, foi desenvolvida e aplicada uma técnica de diagnóstico molecular para identificar e quantificar o genoma do ChPV em diferentes tipos de amostras de aves (suabes cloacais, tecidos e soros). Embora a técnica de qPCR já tenha sido empregada para identificar e quantificar o ChPV (TARASIUK *et al.*, 2012; CARRATALÀ *et al.*, 2012), a quantificação do DNA viral em tecidos de aves com sinais da SMA em comparação com aves saudáveis ainda não foi reportada.

Os resultados obtidos e apresentados no primeiro capítulo da presente dissertação demonstram que a qPCR desenvolvida apresentou alta especificidade e sensibilidade, tendo apresentado sensibilidade de 10 cópias de genomas virais por reação. A aplicação da qPCR nas amostras de suabes de cloaca confirmou que genomas de ChPV foram encontrados em aves saudáveis e de aves com sinais compatíveis com a SMA. Além disso, pela primeira vez foi demonstrada uma significativa diferença ($p \leq 0.0001$) nas cargas virais de ChPV detectados nos suabes de cloaca dos frangos com sinais sugestivos da SMA ($1 \times 10^5/100$ ng DNA; $\pm 2.6 \times 10^5$) em comparação com o grupo saudável ($1,3 \times 10^3/100$ ng de DNA; $\pm 2.7 \times 10^3$).

No segundo capítulo a qPCR desenvolvida foi aplicada a tecidos e soro de aves saudáveis e de aves que apresentavam sinais clínicos compatíveis com SMA. Os resultados obtidos foram comparados com os resultados de uma PCR convencional, capaz de detectar 100 cópias do genoma por reação. Ambas as PCRs detectaram DNA viral em 100% dos frangos analisados (as aves foram consideradas positivas quando pelo menos um dos tecidos foi positivo). O DNA do ChPV foi encontrado em 100% das amostras de bursa de Fabricius, 96,6% das amostras de baço, 93,2% das amostras de intestino, 23,7% das amostras de fígado, 3,4% das amostras de timo e 29,4% das amostras de soro; considerando animais saudáveis e doentes. Esses achados são coerentes com outro estudo que investigou o genoma viral em diferentes amostras de

tecidos de pintos inoculados experimentalmente com o ChPV. Entretanto, o genoma do vírus não foi encontrado nos timos dessas aves inoculadas (ZSAK *et al.*, 2013).

Entre todos os tecidos de frangos com sinais compatíveis com a SMA, os intestinos apresentaram as maiores cargas virais (~5.500 cópias genômicas/300 ng DNA). As cargas virais encontradas na bursa de Fabricius e no baço variaram, mas essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$) em comparação com amostras de intestino. Somente duas amostras de timo foram positivas para o DNA de ChPV (3,4%, 2/59) e a carga viral encontrada neste tecido foi baixa (~12 cópias genômicas/300 ng DNA). As cargas virais encontradas nas amostras de fígado de aves com SMA foram em média 33 cópias genômicas/300 ng DNA.

Os frangos de corte saudáveis, utilizados para a determinação da carga viral em tecidos, pesavam em média 2,44 kg, aos 39 dias de vida. Por outro lado, os frangos de corte de mesma idade, com sinais clínicos da SMA pesavam 1,45 kg, em média 40% menos do que os frangos saudáveis. Essa diferença entre os pesos dos grupos investigados foi significativa ($p \leq 0.0001$), ficando evidente um prejuízo na produção, uma vez que essas aves encontravam-se em idade pré-abate.

Os resultados encontrados nestes estudos evidenciam que o genoma do ChPV estava altamente disseminado nas aves investigadas. Além disso, ficou comprovado, pela primeira vez, que uma maior carga viral em frangos de corte com sinais sugestivos da SMA é observada em relação a aves saudáveis. Com base nesses resultados encontrados, sugere-se que a maior carga viral de ChPV existente em aves com a SMA, em relação a aves saudáveis, seja um dos fatores que favoreçam a ocorrência da SMA.

6 CONCLUSÕES

- ▶ Os resultados obtidos demonstram que o ChPV encontrava-se altamente disseminado nos lotes de aves analisados, sendo o genoma viral detectado tanto em aves com SMA como em aves clinicamente saudáveis.
- ▶ Com a técnica de qPCR foi possível observar que aves com sinais clínicos sugestivos da SMA apresentam significativamente ($p \leq 0.0001$) maior quantidade do ChPV nos suabes de cloaca quando comparado com aves saudáveis.
- ▶ A investigação do peso dos frangos de corte com idade de pré-abate (39 dias) demonstrou que as aves com sinais clínicos sugestivos da SMA apresentam significativamente ($p \leq 0.0001$) menor peso, em média 40% menos que as aves saudáveis.
- ▶ Entre os tecidos das aves investigadas, as bursas de Fabrícus, os baço e os intestinos foram as amostras que demonstraram, respectivamente, maior frequência na detecção do ChPV. Além disso, a carga viral nesses tecidos variou, sendo que o intestino das aves com sinais sugestivos de SMA apresentou as maiores cargas virais (~5,500 copies/300ng DNA).
- ▶ Nos soros e timos de animais saudáveis não foi detectado DNA do ChPV e os fígados desses animais apresentaram concentrações mais baixas de DNA viral (~10 copias/300ng DNA), em comparação com as bursas de Fabricius (~358 copies/300ng DNA), intestinos (~296 copies/300ng DNA) e baços (~135 copies/300ng de DNA).
- ▶ Ambas as técnicas moleculares (PCR convencional e qPCR) utilizadas nos ensaios demonstraram ser capazes de detectar igualmente o ChPV nos tecidos, sendo que a qPCR foi mais sensível.
- ▶ Pela primeira vez, foi demonstrado que as cargas virais de ChPV em tecidos de frangos com sinais sugestivos da SMA são significativamente maiores do que em tecidos de frangos de corte saudáveis. Estes resultados sugerem que a presença de altas cargas de ChPV podem estar associadas a ocorrência da SMA.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, M. J. *et al.* Experimental parvoviral infection in humans. **Journal Infectious Diseases**, v.152, p. 257-265, 1985.

BERNS, K. I.; PARRISH, C. R. Parvoviridae. In: KNIPE, D. M. *et al.* **Fields – Virology**, 6th Ed., v. 2, p. 1768-1791, 2013.

BEST, S. M.; BLOOM, M. E. Pathogenesis of aleutian mink disease parvovirus and similarities to b19 infection. **Journal of Veterinary Medicine. B, Infectious Diseases and Veterinary Public Health**,v.52, n.7-8, p. 331-334, 2005.

BLOOM, M. E.; KERR, J. R. Pathogenesis of parvovirus infections In: KERR, J. *et al.* **Parvoviruses**, New York, p. 323-336, 2005.

BOISVERT, M. *et al.* Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. **Journal of Virology**, v. 84, n. 15, p. 7782-7792, 2010.

BOSCHETTI, N. *et al.* Stability of minute virus of mice against temperature and sodium hydroxide. **Biologicals**, v. 31, n. 3, p. 181-185, 2003.

BROLL, S.; ALEXANDERSEN, S. Investigation of the pathogenesis of transplacental transmission of aleutian mink disease parvovirus in experimentally infected mink. **Journal of Virology**, v. 70, n. 3, p. 1455–1466, 1996.

CARRATALÀ, A. *et al.* A novel tool for specific detection and quantification of chicken/turkey parvoviruses to trace poultry fecal contamination in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 20, p. 7496–7499, 2012.

CARVALHO, A. F. M. Síndrome da desuniformidade tardia em frangos de corte. **Revista Avicultura Industrial**, edição 1214, ano 103, n.8, 2012.

CHANG, P. C. *et al.* Phylogenetic analysis of parvoviruses isolated in Taiwan from ducks and geese. **Avian Pathology**, v. 29, p. 45–49, 2000.

CLARK, F. D.; JONES, F. T. **Runting-stunting syndrome in broilers**, **The Poultry site**. University of Arkansas, Division of Agriculture and published in Avian Advice, Spring 2008. Disponível em:
<http://www.thepoultrysite.com/articles/1110/runtingstunting-syndrome-in-broilers/>.
Data de acesso: 10/08/2014.

COGBURN, L. A. *et al.* Physiology of growth and development. In: Whittow, G. **Sturkie's Avian Physiology**. 5ª Ed., University of Hawaii at Manoa, Honolulu, U.S.A., p. 635-649, 2000.

COTMORE, S. F. *et al.* The family *Parvoviridae*. **Archives of Virology**, v. 159, p. 1239–1247, 2014.

COTMORE, S. F.; TATTERSALL, P. Parvoviruses. In: KERR, J. R. *et al.* **A rolling-hairpin strategy: basic mechanisms of DNA replication in the parvovirus**. Taylor & Francis Group, Nova York, p. 171- 185, 2005.

COTMORE, S. F.; TATTERSALL, P. Parvovirus diversity and DNA damage responses. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, v.5, n. 2, 2013.

DAY, M. J.; ZSAK, L. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. **Virology**, v. 399, p. 59–64, 2010.

DECAESSTECKER, M.; *et al.* significance of paroviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of the chicken malabsorption syndrome. **Avian Pathology**, v. 15, p. 769-782, 1986.

DERZSY, D.*et al.* Viral disease of goslings. Isolation, properties and antigenic pattern of the virus strains. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 20, n. 4, p. 419-28, 1970.

DESOUZART, O. Tecnologias. In:____ Evolução da Produção Avícola entre os principais produtores mundiais – 1992 e 2010. **Revista Ave World**, Ano 9, n.51, p.34-39, 15 abril/maio, 2011.

DOMANSKA-BLICHAZ, K. *et al.* Genetic characterization of parvovirus circulating in turkey and chicken flocks in Poland, **Archives of Virology**, v. 157, p.2425-2430, 2012.

ENTERPI, M. *et al.* Virucidal activity of disinfectants against parvoviruses and reference viruses. **Applied Biosafety**, v. 15, n. 4, 2010.

ETERPI, M., *et al.* Disinfection efficacy against parvoviruses in comparison to reference viruses. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 64-70, 2009.

FINKLER, F. *et al.* (*in submission*) **Chicken parvovirus viral loads in cloacal swabs from malabsorption syndrome-affected and healthy broilers**. Detecção e quantificação do genoma de Parvovirus de galinha (ChPV) em frangos de corte saudáveis e com síndrome da má absorção. Dissertação de mestrado, UFRGS, Porto Alegre, 2015.

FLORES, E. F. Diagnóstico laboratorial das infecções víricas. In:____ **Virologia Veterinária**, Ed UFSM, Santa Maria, p.295-326, 2012.

FLORES, E. F. Estrutura e composição dos vírus. In: _____ **Virologia Veterinária**, Ed UFSM, Santa Maria, p. 19-36, 2007.

FLORES, E. F.; KREUTZ, L. C. Replicação viral. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Ed UFM, Santa Maria, p. 107-135, 2007.

GONTANG, E. *et al.* Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, n. 10, v. 73, p. 3272–3282, 2007.

GOUH, R. E. Goose parvovirus (Derzsy's disease). In: CHAIRMAN, D. E. S. *et al.* **A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4^{ed} American Association of avian pathologists, p. 219-234, 1998.

GUIMARÃES, J. H; LEFFER, A. M. C. Ectoparasitas e outros artrópodes importantes para a indústria avícola brasileira. In: JUNIOR, A. B. *et al.* **Doença das Aves – 2^a edição**. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, p. 867-905, 2009.

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

ITO, N. M. K. *et al.* Fisiopatologia do sistema digestório e anexos. In: JUNIOR, A. B. *et al.* **Doença das Aves – 2^a edição**. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, p. 215-263, 2009.

KIM, A. B. Polymicrobial diseases of animals and humans. In: KIM, A. B.; JANET, M.G. **Polymicrobial Diseases**. Respiratory Diseases of Livestock Research Unit, National Animal Disease Center, Agriculture Research Service, U.S. Department of Agriculture, Ames, Iowa, 2002. Disponível em:<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2477/>>. Data de acesso: 10/01/2015.

KISARY, J. *et al.* Presence of fowl parvovirus in fibroblast cell cultures prepared from uninoculated white leghorn chicken embryos. **Avian Pathology**, v. 16, p. 115-121, 1987.

KISARY, J. *et al.* Presence of Parvoviruses in the Intestine of chickens Showing Stunting Syndrome. **Avian Pathology**, v. 13, p. 339-343, 1984.

KISARY, J. *et al.* The Genome Structure of a New Chicken Virus Identifies It as a Parvovirus. **Journal General Virology**, v. 66, p. 2259-2263, 1985.

KISARY, J. Experimental infection of chicken embryos and day-old chickens with parvovirus of chicken origin. **Avian Pathology**, v. 14, p. 1-7, 1985 (a).

KISARY, J. Indirect immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 14, p. 269-273, 1985 (b).

KISARY, J.; DERZSY, D. Viral disease of goslings. IV. Characterisation of the causal agent in tissue culture system. **Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae**, v. 24, p. 287- 289, 1974.

KOO, B. S *et al.* Molecular survey of enteric viroses in comercial chicken farms in Korea with a history of enteritis. **Poultry Science**, v. 92, p. 2876-2885, 2013.

KOUWENHOVEN, B. *et al.* **Runting and stunting syndrome in broilers-the disease with many names and faces.** In: Proceedings of the Post Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sydney, n. 66, p. 73–79, 1983.

MARTINS, N. R. S; RESENDE, J. S. Adenoviroses, reoviroses, rotaviroses, e viroses intestinais. In: JUNIOR, A. B. *et al.* **Doença das Aves** – 2ª edição. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, p. 677-710, 2009.

MCNULTY, M. S. *et al.* Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. **Avian Pathology**, v. 12, p. 45- 54, 1983.

METTIFOGO, E. *et al.* Emergence of Enteric Viruses in Production Chickens Is a Concern for Avian Health. **Scientific Journal Hindawi**, v.2014, Article ID450423, 8 pg, 2014.

MORAES, M. P.; COSTA, P. R. S. Parvoviridae. In: FLORES, E. F. **Virologia Veterinária**, Ed UFSM, Santa Maria, p. 441–480, 2012.

MURRAY, P. R. *et al.* Microbiologia médica. **Parvovírus**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 490-494, 2014.

MUZYCZKA, M.; BERNS, K.I. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds). **Fields Virology**. 4. ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 69, p. 2327-2359, 2001.

NUÑEZ, L. F. *et al.* Isolation and molecular characterisation of Chicken parvovirus from Brazilian flocks with enteric disorders. **British Poultry Science**, 30 de janeiro, 2015.

PAGE, R.K. *et al.* Malabsorption syndrome in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 26, p. 618-624, 1982.

PALADE, E. A. Epidemiological study of viral pathogens incriminated in enteric disease complexes in Hungarian broiler flocks, with special emphasis on the newly identified parvovirus. Tese de doutorado. **Hungarian Veterinary Archive**, 2011.

PALADE, E. A. *et al.* Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. **Avian Pathology**, v. 40, n. 2, p. 191-197, 2011.

PATRÍCIO, I. S. Síndrome de má absorção em pintos de corte – Refugagem. **Revista Avicultura Industrial**, 30/8/2010. In: _____ Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/sindrome-de-ma-absorcao-em-pintos-de-corte--refugagem/20100830144356_D_510>. Data de acesso: 12/08/14.

PATRÍCIO, I. S.; SILVA, E. N. da. Refugio em granjas. **Revista Avicultura Industrial**, 12/11/2008. In: _____ Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/noticia/refugo-em-granjas/20081112134908_36620>. Data de acesso: 12/08/14.

REBEL, J. M. J. *et al.* Malabsorption syndrome in broilers. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, p. 17-29, 2006.

REYNOLDS, D. L. Enteric Viruses. In: CHAIRMAN, D. E. S. *et al.* **A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4ª edição, American Association of avian pathologists, p. 175-184, 1998.

SAIF, Y.M. Viral enteric infections. In: Glisson *et al.* **Diseases of Poultry**, Publishing, Ames, Iowa, EUA. 13th ed., p. 329-330, 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3ª edição, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SANTOS, C. F. C. Diagnóstico microbiológico e Sorológico. In: JUNIOR, A. B. *et al.* **Doença das Aves** – 2ª edição. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, Campinas, p. 79-101, 2009.

SCHETTLER, C. H. Virus hepatitis of geese. II. Host range of goose hepatitis virus. **Avian Diseases**, v. 15, p. 809–823, 1971.

SENNE, D. A. Virus propagation in embryonating eggs. In: CHAIRMAN, D. E. S. *et al.* **A Laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens**. 4ª edição, American Association of avian pathologists, p. 235-240, 1998.

SHACKELTON, L. A. *et al.* High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.**, v. 102, p. 379-384, 2005.

SILVA, S. E. L. da; *et al.* Epidemiological aspects of *Astrovirus* and *Coronavirus* in poults in the south eastern region of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 248-253, 2009.

SMITH, F. M. *et al.* The cardiovascular system. In: Whittow, G. **Sturkie's Avian Physiology**. 5ª Ed., University of Hawaii at Manoa, Honolulu, U.S.A., p. 141-223, 2000.

STROTHER, K. O.; ZSAK, L. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Detect Chicken Parvovirus-Specific Antibodies. **Avian Diseases**, v. 53, p. 585- 591, 2009.

TARASIUK, K. *et al.* Occurrence of Chicken Parvovirus Infection in Poland. **The Open Virology Journal**, v. 6, p. 7-11, 2012.

TEIXEIRA, T. F. *et al.* Torque tenosus virus (TTSuV) in tissues of pigs and its relation with the occurrence of post weaning multisystemic wasting syndrome. **Virus Genes**, v. 47, p. 276–281, 2013.

TRAMPEL, D. W. *et al.* Parvovirus-like enteropathy in missouri turkeys. **Avian Diseases**, v.27, p. 49-54, 1983.

UBABEF, União Brasileira de Avicultura e Associação Brasileira dos Produtores e Exportadores de carne de Frango. **Relatório anual 2014**. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Data de acesso: 14/07/ 2014.

XIE, Q.; CHAPMAN, M. S. Virus world: Canine Parvovirus (4dpv). Canine parvovirus capsid structure, **Journal of Molecular Biology**, 264: 497-520, 1996. Images at virology.wisc.edu/virusworld.,1999. Disponível em: <<http://www.virology.wisc.edu/virusworld/images/cpv-mesh-2x.jpg>> Data de acesso: 10.12.2014.

ZADORI, Z. *et al.* Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2. **Virology**, v. 212, n. 2, p. 562–573, 1995.

ZAVALA, G. **Runting stunting syndrome (RSS) in broilers: In vivo studies.** 2006. Disponível em: <http://www.poultry-health.com/fora/inthelth/zavala_wpdc_06.pdf>. Data de acesso: 12/02/15.

ZAVALA, G.; BARBOSA, T. **Runting and stunting in broiler chickens.** Apinco-Facta, 2006. Disponível em: <http://www.poultryhealth.com/fora/inthelth/zavala_apinco_06.pdf>. Data de acesso: 12/02/15.


ZSAK, L. Enteric parvovirus infections of chicken and turkeys. In: SAIF, Y. M. Viral enteric infections. **Diseases of Poultry**, Publishing, Ames, Iowa, EUA. 13ª edição, p. 329-330, 2013.

ZSAK, L. *et al.* Chicken parvovirus – induced runting-stunting syndrome in young broilers. **Avian Diseases**, v. 57, p.123–127, 2013.

ZSAK, L. *et al.* Development of a polymerase chain reaction procedure for detection of chicken and turkey parvoviruses. **Avian Diseases**, v. 53, n. 1, p. 83-88, 2009.

ZSAK, L. *et al.* Partial genome sequence analysis of parvoviruses associated with enteric disease in poultry. **Avian Pathology**, v. 37, p. 435-441, 2008.

ANEXO A - Parecer favorável à pesquisa concedido pelo CEUA – IPVDF.



Ofício n.º 07/14 – CEUA/IPVDF Eldorado do Sul, 23 de abril de 2014.

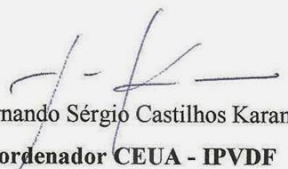
Senhora Pesquisadora:

Com relação ao Projeto de Pesquisa – OCORRÊNCIA DE PARVORÍRUS DAS GALINHAS (CHPV) EM FRANGOS COMERCIAIS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL – protocolado para análise e parecer sob n.º. 04/2014, pela mestrandia Fabrine Finkler, em 12 de março de 2014, cabe referir o seguinte:

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-IPVDF) reuniu-se extraordinariamente nos dias 03 e 14 de abril de 2014, no Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor e, após as solicitações feitas terem sido atendidas, emite **PARECER FAVORÁVEL** à respectiva pesquisa, cuja coleta de amostras está prevista para maio de 2014.

É o parecer.

Atenciosamente,



Fernando Sérgio Castilhos Karam
Coordenador CEUA - IPVDF