

## HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* PARA DETECÇÃO DO VÍRUS DA ANEMIA INFECCIOSA DAS GALINHAS (CAV) E GIROVÍRUS AVIÁRIO TIPO 2 (AGV2)

**Germana Vizzotto Osowski<sup>1</sup>; Alessandra D'Avila<sup>2</sup>; Marcos Mores<sup>3</sup>; Fátima Regina Ferreira Jaenisch<sup>3</sup>; Kelen Regina Ascoli Baldi<sup>4</sup>; Paulo Esteves<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Campus Joaçaba, Estagiária na Embrapa Suínos e Aves, Bolsista CNPq/PIBIC. germanavizzottoosowski@hotmail.com

<sup>2</sup>Pós doutorado Empresarial – CNPq

<sup>3</sup>Embrapa Suínos e Aves

<sup>4</sup>Funcionária do Setor de Histopatologia do CEDISA

**Palavras-chave:** histopatologia, lâminas histológicas, hibridização *in situ*, sonda, agentes infecciosos.

### INTRODUÇÃO

O vírus causador da anemia infecciosa das galinhas (CAV), membro do gênero *Gyrovirus*, família *Circoviridae* (genoma de DNA pequeno, circular e de fita simples) e o girovírus aviário tipo 2 (AGV2), recentemente identificado e, que, apesar de apresentar baixa homologia genômica com o CAV, sugere-se, que seja também pertencente ao gênero *Gyrovirus*, encontram-se amplamente distribuídos, podendo ser detectados na maioria das criações comerciais de aves (1, 2). Embora o CAV esteja diretamente ligado a episódios que resultam em perdas econômicas na avicultura devido à ocorrência de imunossupressão em galinhas que não apresentam imunidade a este agente, até o presente momento desconhece-se a real participação do AGV2 em alguma doença aviária. Frente a esse cenário, para que seja possível avaliar o papel da presença do AGV2 na saúde das aves, é necessário que se tenham técnicas de diagnóstico que possam ser utilizadas para detecção de ambos os vírus, mas principalmente do AGV2. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo a padronização de uma técnica de hibridização *in situ* (ISH) visando à detecção destes agentes. Tal prova (ISH) baseia-se no anelamento de duas sequências de ácidos nucleicos específicos (sonda + genoma-alvo), complementares entre si, que são detectados diretamente nos tecidos fixados e processados para histopatologia. Através da utilização desta técnica existe a possibilidade da realização de estudos retrospectivos utilizando como material de análise tecidos previamente fixados em blocos de parafina ou lâminas histológicas. Este método permite a identificação de células que contenham a região-alvo, fornecendo informações sobre a localização intracelular, celular ou tecidual dos ácidos nucleicos em questão. A hibridização *in situ* trata-se de uma técnica de diagnóstico indireta e não radioativa, onde se utiliza um marcador (digoxigenina) ligado a anticorpos específicos, que reconhecem a molécula repórter que está ligada química ou enzimaticamente à sonda, permitindo, dessa forma, a detecção indireta de uma determinada sequência nucleotídica (3).

### MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados órgãos (bursa, medula óssea e timo) de aves previamente inoculadas com o vírus causador da anemia infecciosa das galinhas (CAV) e com o girovírus aviário tipo 2 (AGV2), sendo os testes histológicos realizados separadamente para ambos os vírus. Em seguida, os órgãos foram processados, o que incluiu: fixação em formol, inclusão em bloco de parafina e subsequentes realização de cortes do material em uma espessura de 2 micras ( $\mu\text{m}$ ). A seguir, o material foi submetido a tratamento com xilol e etanol em concentrações crescentes para desparafinização e reidratação dos tecidos. Após, os tecidos foram incubados com uma solução que continha a sonda de DNA marcada sendo que, posteriormente a reação de hibridização os tecidos foram lavados para remoção das sondas não ligadas. A sonda consistia de uma sequência de nucleotídeos complementar à sequência-alvo do genoma viral, que foi sintetizada e conjugada a um marcador (digoxigenina) utilizando-se o kit PCR DIG Probe Synthesis (Roche<sup>®</sup>) (4). A presença de sonda e, conseqüentemente, do ácido nucleico viral, foi indicada pela mudança de coloração do substrato nas células infectadas.

### RESULTADOS E DISCUSSÕES

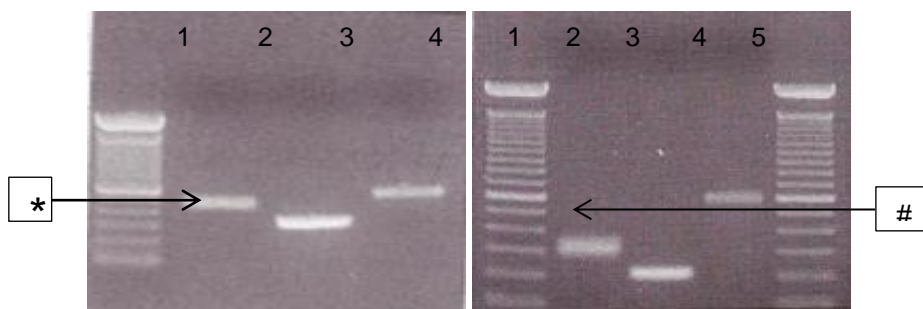
Utilizando-se a sonda marcada (Fig. 1), foi possível verificar a presença da coloração esperada no material proveniente de aves infectadas com CAV e AGV2 (Fig. 2), sendo que tal coloração não foi evidenciada no material proveniente das aves não infectadas (Fig. 3).

### CONCLUSÕES

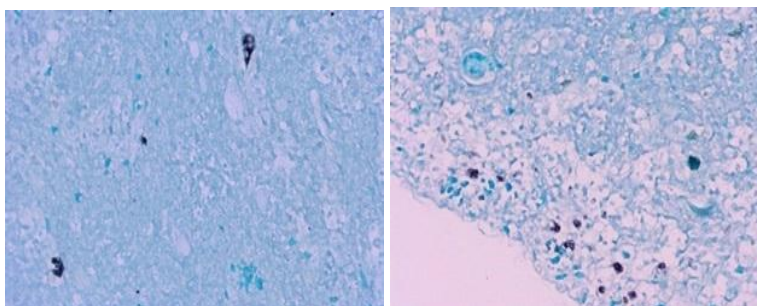
Conforme descrito no presente trabalho, os resultados alcançados foram satisfatórios no que diz respeito à padronização das técnicas de ISH visando à detecção de CAV e AGV2. Quando estiverem devidamente padronizadas estas ferramentas poderão ser utilizadas para verificação da dispersão de tais agentes nos diversos tecidos de aves infectadas, bem como os efeitos de tais infecções em seus hospedeiros sendo possível, dessa forma, entender melhor a ecologia destes agentes.

### REFERÊNCIAS

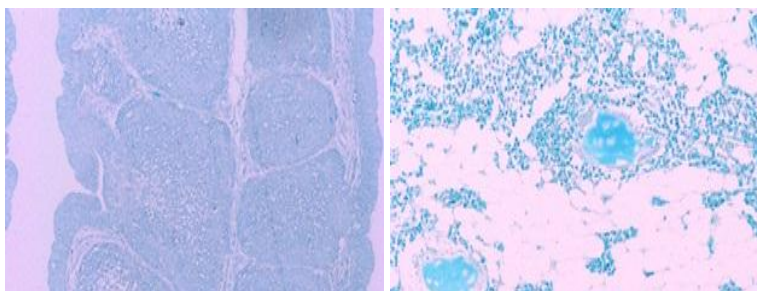
1. RIJSEWIJK, F.A.M.; TEIXEIRA, T.F.; SANTOS, H.F.; DEZEN, D.; FRANCO, A.C.; ROEHE, P.M. Discovery of a genome of a distant relative of chicken anemia virus reveals a new member of the genus Gyrovirus **Archives of Virology**, v.1, n.87, p.1. 2011.
2. SANTOS, Helton F.; KNAK, Marcus B.; CASTRO, Fernanda L. Variants of the recently discovered avian gyrovirus 2 are detected in southern Brazil and the Netherlands. **Veterinary Microbiology**, v.173, n.48, p.230-236. 2011. Disponível em: <<http://http://www.ufrgs.br/labvir/artigos/artigo98.pdf>>. Acesso em: 02 set. 2014.
3. FLORES, Eduardo Furtado; SCHERER, Charles. **Diagnóstico Viroológico**. In: *Virologia Veterinária*, 1. ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2008. 61 p.
4. **Manual de aplicação DIG: Hibridização In Situ não radioativa**. 4 ed. Alemanha: Roche Diagnostics GmbH, 2008. 224 p.



**Fig. 1.** Gel de agarose corado com brometo de etídio visualizado à luz ultravioleta  
 Linha 1: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen ®). Linha 2: sonda para AGV2 e CAV marcada com digoxigenina (aprox. 450pb para AGV2 e aprox. 300pb para CAV). Linha 3: controle da reação sem digoxigenina (aprox. 350pb para AGV2 e aprox. 190pb para CAV). Linha 4: controle da reação utilizando reagentes do Kit (aprox. 500pb). Linha 5: padrão de peso molecular 100pb (Invitrogen ®). \* (AGV2 marcado com digoxigenina); # (CAV marcado com digoxigenina).



**Fig. 2.** Corte histológico do timo. Aves infectadas pelo vírus AGV2 (esquerda) e CAV (direita). As células marcadas apresentaram granulócitos aleatórios dispersos no parênquima, principalmente na região cortical e medular



**Fig. 3.** Corte histológico da bursa (esquerda) as células negativas para ácidos nucleicos do AGV2 e medula óssea (direita) células negativas para ácidos nucleicos do CAV