

DETECÇÃO DE VÍRUS RESPIRATÓRIOS AVIÁRIOS EM AMOSTRAS DE TECIDOS DE AVES POR TÉCNICAS MOLECULARES

Alessandra A. Simasaki; Laís S. Rizotto; Clarice W. Arns; Helena L. Ferreira

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

alessandra.simasaki@usp.br

Objetivos

O projeto consistiu em verificar a presença dos vírus aviários respiratórios em amostras de *Gallus gallus* através das técnicas moleculares.

Métodos e Procedimentos

Foram utilizadas 19 amostras de tecidos de aves domésticas (*Gallus gallus*) cedidas pela Dra. Clarice Weis Arns, sendo manuseadas em conformidade com o Comitê de Ética e Uso de Animais da Universidade de São Paulo (CEUA-FZEA: 3395201219). Estas amostras, coletadas entre 2018 e 2019, foram oriundas de uma granja experimental situada em São Paulo. Após a extração de DNA e RNA dos tecidos, foi realizado a detecção dos agentes virais através das técnicas moleculares. Para a detecção do ILTV (Vírus da Laringotraqueíte Infecciosa), aMPV (Metapneumovírus Aviário), IBV (Vírus da Bronquite Infecciosa) e AIV (Vírus da Influenza Aviária) utilizamos a técnica de PCR nested, RT-PCR nested e RRT-PCR. Para tal ação, utilizamos os estudos de Chacón et al. (2008), Naylor et al. (1997), Juhasz et al. (1994), Bochkov et al. (2007) e Spackman et al. (2002). Os amplicons oriundos dos processos de PCR nested e RT-PCR nested foram revelados no método de eletroforese em gel de ágar. As amostras positivas para aMPV foram subtipadas durante o processo de RT-PCR nested. Já para IBV, a sorotipagem foi feita com o método de sequenciamento Sanger.

Resultados

Das 19 amostras, quinze foram positivas para IBV sendo que onze destas eram do sorotipo Massachusetts (Mass) e três para variante brasileira (BR-I). Foi observado também cinco amostras positivas para aMPV, visto que três

destas eram do subtipo B, um para subtipo A, e um para ambos subtipos. O AIV e ILTV não foram detectados em nenhuma das amostras testadas.

Conclusões

Os testes demonstraram uma alta frequência de IBV do sorotipo Mass, que é uma estirpe vacinal. Este resultado coincide com o fato de que o mesmo é comumente utilizado nos protocolos de vacinação em granjas comerciais. Em adição, os resultados negativos para a AIV assimilam-se com dados epidemiológicos de que o nosso território é livre deste agente.

Referências Bibliográficas

- BOCHKOV, Y. A.; TOSI, G.; MASSI, P.; DRYGIN, V. V. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes*, v.35, issue 1, p. 65-71. 2007.
- CHACÓN, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. *J. of Virol. Methods*, 151, p. 188-193. 2008.
- JUHASZ, K.; EASTON, A.J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75(pt 11), p. 2873-2880. 1994.
- NAYLOR, C.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathology*, 26, p. 327-338. 1997.
- SPACKMAN, E.; SENNE, D.A.; MYERS, T.J.; BULAGA, L.L.; GARBER, L.P.; PERDUE, M.L.; LOHMAN, K.; DAUM, L.T.; SUAREZ, D.L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. of Clin. Micro.*, 3256-3260. 2002.

DETECTION OF AVIAN RESPIRATORY VIRUS IN SAMPLE TISSUES FROM BIRDS BY MOLECULAR ASSAYS

Alessandra A. Simasaki; Laís S. Rizotto; Clarice W. Arns; Helena L. Ferreira

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

alessandra.simasaki@usp.br

Objective

The project consisted of verifying the presence of respiratory avian viruses in *Gallus gallus* samples using molecular techniques

Materials and Methods

19 samples of avian tissues (*Gallus gallus*) kindly provided by Prof. Dr. Clarice Weis Arns, were used, being handled in compliance with the Animal Use and Ethics Committee of University of São Paulo (CEUA-FZEA: 3395201219). These samples were collected between 2018 and 2019 and came from an experimental farm located in São Paulo. After the DNA and RNA extraction from tissues, molecular techniques were used to detect the viral agents. For the detection of ILTV (Infectious laryngotracheitis virus), aMPV (avian metapneumovirus), IBV (infectious bronchitis virus) and AIV (avian influenza virus) nested PCR, nested RT-PCR and RRT-PCR techniques were used. For this action, studies by Chacón et al. (2008), Naylor et al. (1997), Juhasz et al. (1994), Bochkov et al. (2007) and Spackman et al. (2002) were used. The amplicons from nested PCR and nested RT-PCR were revealed in the electrophoresis in agar gel methodology. For IBV, serotyping was performed using the Sanger sequencing method.

Results

From 19 samples, fifteen were positive for IBV being 11 from the serotype Massachusetts (Mass) and three for the Brazilian (BR-I) variant. In addition, five samples were positive to aMPV, being three of these subtype B, one subtype A and one for both subtypes. AIV and

ILTV were not detected in any of the samples tested.

Conclusions

The results showed a high IBV Mass serotype frequency which is a vaccinal strain. This result coincides with the fact that it is commonly used in vaccination protocols in commercial farms. In addition, the negative results for AIV are similar to epidemiological data that our territory is free of this agent.

References

- BOCHKOV, Y. A.; TOSI, G.; MASSI, P.; DRYGIN, V. V. Phylogenetic analysis of partial S1 and N gene sequences of infectious bronchitis virus isolates from Italy revealed genetic diversity and recombination. *Virus Genes*, v.35, issue 1, p. 65-71. 2007.
- CHACÓN, J. L.; FERREIRA, A. J. P. Development and validation of nested-PCR for the diagnosis of clinical and subclinical infectious laryngotracheitis. *J. of Virol. Methods*, 151, p. 188-193. 2008.
- JUHASZ, K.; EASTON, A.J. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J. Gen. Virol.* 75(pt 11), p. 2873-2880. 1994.
- NAYLOR, C.; SHAW, K.; BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Appearance of type B avian pneumovirus in Great Britain. *Avian Pathology*, 26, p. 327-338. 1997.
- SPACKMAN, E.; SENNE, D.A.; MYERS, T.J.; BULAGA, L.L.; GARBER, L.P.; PERDUE, M.L.; LOHMAN, K.; DAUM, L.T.; SUAREZ, D.L. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J. of Clin. Micro.*, 3256-3260. 2002.