

PCR AVIPOXVÍRUS

ISABEL SILVA WETZEL¹; RENATA NOBRE DA FONSECA, LAURA MORAIS NASCIMENTO SILVA, SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER²; GILBERTO D' ÁVILA VARGAS³

¹Universidade Federal de Pelotas – isabelwetzel1@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – silviaohubner@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gavilavargas@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os avipoxvírus provocam uma doença comum nas aves denominada buba aviária ou varíola aviária (FLORES, 2007). Os poxvírus pertencem a família Poxviridae, apresentam genoma consistindo em uma molécula de DNA de fita dupla com 130 a 300kb. Seus membros são classificados em subfamílias: Entomopoxvirinae, vírus que infectam insetos; e Chordopoxvirinae, vírus que infectam vertebrados. A subfamília Chordopoxvirinae é formada de 8 gêneros, sendo um deles Avipoxvírus, onde estão os maiores poxvírus, com DNA de 300kb e com capacidade de infectar mais de 232 espécies de aves silvestres e domésticas por todo o mundo (BOLTE et al, 1999).

A buba aviária ocorre na forma diftérica e ou cutânea. A forma cutânea é a mais comum e as lesões evoluem de pápulas para vesículas, pústulas e crostas, atingindo regiões desprovidas de penas, principalmente cabeça, pescoço, patas, pernas, e ao redor da cloaca. A forma diftérica, e menos comum, se caracteriza por lesões na parte superior do trato respiratório e digestivo, que podem desencadear dispneia, inapetência, descarga nasal e ocular. Nas mucosas as lesões se apresentam como placas salientes de coloração amarelada.

A reação de polimerase em cadeia (PCR) é uma técnica de amplificação de ácidos nucleicos que permite a detecção e identificação de qualquer vírus que disponha de sequências nucleotídicas, e vem sendo utilizada para identificação de avipoxvírus em todo o mundo (GYURANECZ et al, 2013). Nesse trabalho foi realizada a padronização de um teste de PCR para a identificação e amplificação de um gene capaz de detectar diversas cepas de avipoxvírus, inclusive de diferentes aves silvestres, para futuramente ser realizada uma análise filogenética dos vírus que circulam na região sul do Brasil.

2. METODOLOGIA

Foram utilizadas 4 amostras de lesões de buba tecido, armazenadas a -20°C, provenientes de 2 canários e 2 pombas, nominadas respectivamente: 7769, 7636, 11/07, 8/5/08. As amostras foram maceradas com pistilo e diluídas em 1 ml de DNAzol. Cada solução de amostra foi transferida para um respectivo microtubo e então foram centrifugadas. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado etanol 100% para ocorrer a precipitação do DNA, e centrifugado novamente. Foi realizada a lavagem do DNA com 0,8 mL de etanol 75% até o desaparecimento de visíveis impurezas. Após, adicionou-se NaOH 8mM para solubilizar o pellet de DNA e foi adicionado Hepes (0,1M). A quantificação do DNA extraído, foi realizada no equipamento NanoDrop (Life Thermo scientific).

Para amplificar o fragmento de um gene da DNA polimerase do avipoxvírus, um sistema de PCR foi produzido com base numa sequência de gene da DNA polimerase do fowlpox virus (vírus de galinha). Foi elaborado um par de primers com capacidade de identificar uma variedade maior de avipoxvírus PPolF 5'-GGCYAGTACKCTTATYAAAGG-3' e PPolR 5'-CGTCTCTACGTGTTCGCT-3' de um consenso entre o alinhamento das sequências de genes da DNA polimerase do fowlpox e canarypoxvirus (GYURANECZ et al, 2013).

A PCR foi realizada no termociclador Gradient Thermal Cycler. Para cada amostra foi utilizado 12,6 µL de master mix (Promega), 7,5 µL de água ultrapura, 1 µL de primer forward e 1 µL de primer reverse (200nm), além de 3 µL de DNA extraído de cada amostra de tecido (7769,7636,11/7, 8/5/08) ou do DNA extraído de vacina (Bouba das aves - cepa forte - Biovet), como controle. Reações sem DNA, foram incluídas como controle negativo

A reação consistiu inicialmente na desnaturação por 5 minutos a 95°C seguido de 40 ciclos de amplificação consistindo de desnaturação de 30 segundos a 95°C, anelamento de primer a 50°C por 30 segundos, e extensão a 72°C por 1 minuto e 20 segundos. A extensão final ocorreu por 5 minutos a 72°C.

Após a amplificação, 5 µL de cada amostra junto a 2 µL de marcador de corrida (GLB) foram pipetadas no gel de agarose 1%, e utilizou-se o marcador DNA(Ladder 100 PB 500 µL – Ludwig Biotec). O resultado do DNA amplificado foi visualizado em luz UV através da coloração do GelRed(Biotium GelRed).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização do PCR com a utilização de primers PpolF e PpolR do gene DNA polimerase demonstrou sucesso na identificação de avipoxvírus. Conforme pode ser observado na figura 1, foi obtido resultado positivo com as amostras 7769 e 7636, ambas de canários. As amostras 11/7 e 8/5/08, provenientes de pombas, não amplificaram. Novas extrações destas amostras serão realizadas.

Esses resultados iniciais permitem afirmar poderá ser utilizado para identificação de avipoxvírus em variadas amostras virais de lesões de diversas espécies de aves silvestres. Futuramente será realizado sequenciamento genômico e análise filogenética dos avipoxvírus detectados nas aves da região sul do Brasil.

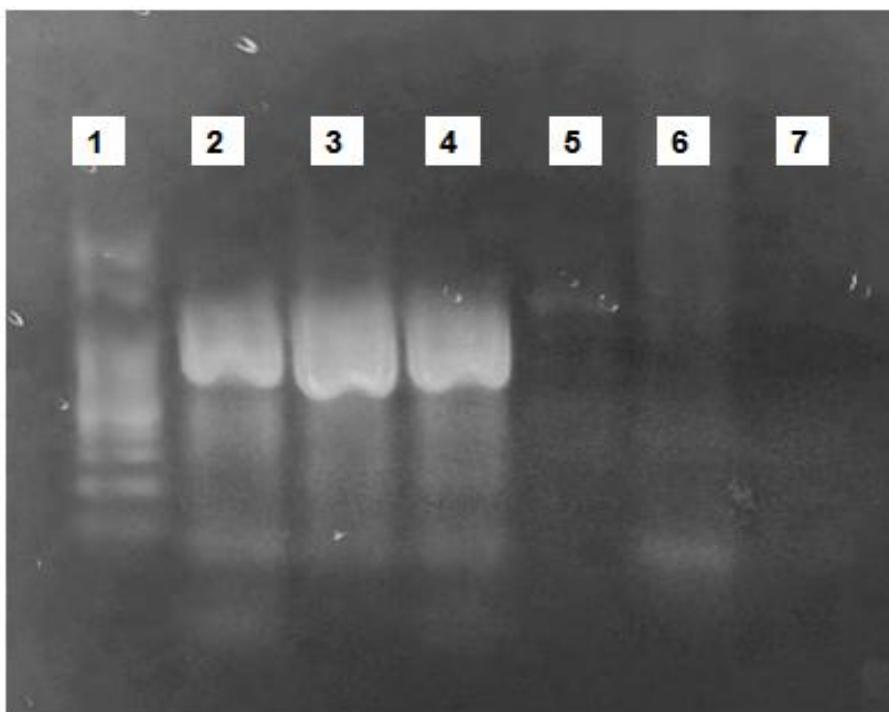


Figura 1:

Amplificação de PCR com a utilização de primers PpolF e PPoIR do gene DNA polimerase (900 PB) de avipoxvírus isolados nesse estudo, com visualização através de GelRed(Biotium GelRed) em gel agarose e luz UV. Linha 1, marcador DNA (Ladder 100 PB) ; linha 2, controle positivo vacina Biovet; linha 3, amostra 7769 canário ; linha 4, amostra 7636 canário; linha 5, amostra 11/07 pomba ; linha 6, amostra 8/05/08 pomba; linha7, controle negativo.

4. CONCLUSÕES

O PCR demonstrou sucesso na identificação de avipoxvírus nas amostras utilizadas, sendo válido para futuros estudos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLTE, A.L.; MEURER, J; KALETA, E.F . Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathology*, United Kingdom , 28(5), p 415-432, 1999.

GYURANEZ, M; FOSTER. T, J; DÁN, A; IP S, H; EGSTAD F,K; PARKER G, P; HIGASHIGUCHI M, J; SKINNER A, M; HÖFLE, U; KREIZINGER, Z; DORRESTEIN M, G; SOLT, S; SÓS, E; KIM, Y.J; UHART, M; PEREDA, A; GONZÁLEZ-HEIN, G; HIDALGO, H; BLANCO, J-M; ERDÉLYI, K. Worldwide Phylogenetic Relationship of Avian Poxviruses. *Journal of Virology*. Washington DC, v87, p. 4938–4951, 2013.

FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*. Santa Maria: Editora da UFSM, 2007.

