

210 dia de vida os animais do grupo estressado por calor foram submetidos ao aumento da temperatura ambiental a 37°C em intervalos de 12 horas. No 210 dia os animais foram eutanasiados e foram obtidas porções do duodeno, jejuno e íleo destinadas ao procedimento de extração de RNA. O RNA das porções intestinais foi submetido a expressão de citocinas (IFN-alfa, IFN-gamma, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-17, TGF-beta, TNFSF-15) e receptores (TLR2 e TLR4) por PCR em tempo real. Para determinação da expressão relativa foram utilizados como controles endógenos os genes beta-actina e GAPDH. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância baseado em permutação seguido pelo teste de TukeyHSD. A análise dos componentes principais foi utilizada para determinação das variações intra e intergrupo. **Resultados e Discussão:** O estresse por calor aumentou de forma significativa a expressão relativa das citocinas IL-1, IL-2, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, TGF-beta, IFN alfa e beta nas porções intestinais e as diferenças entre as médias foram mais acentuadas nas porções intestinais proximais. Os dados concordam com os efeitos de comportamento doentio e aumento de citocinas como IL-1. O aumento generalizado das expressões relativas de citocinas foi acompanhado pelo aumento significativo da expressão do TLR4, que não foi acompanhado por diferenças de expressão do TLR2. Tais ativações contribuem para a manutenção da proteção intestinal relacionada a processos infecciosos como os produzidos pelo *C. perfringens* e concordam com a observação de que o estresse por calor reduz o processo infeccioso causado pela *Eimeria* sp. **Conclusões:** O estresse por calor isolado promove o aumento da expressão de citocinas relacionadas ao comportamento doentio e de fatores capazes de aumentar a produção e secreção de defensas no epitélio intestinal. **Palavras-chave:** Frangos de corte. Citocinas. Estresse por calor.

### GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY FOR PARASITE BURDEN IN CANINE VISCERAL LEISHMANIASIS

BATISTA, LUÍS FÁBIO DA SILVA 1; UTSUNOMIYA, YURI TANI 2; DIAS, RAÍSSA DE ANDRADE 1; DA SILVA, THAÍS BRUNA FERREIRA 1; TOMOKANE, THAÍSE YUMIE 1; PACHECO ACÁCIO DUARTE 2; MARCONDES, MARY 2; NUNES, CÁRIS MARONI 2; LAURENTI, MÁRCIA DALASTRA 1

1 Laboratory of Pathology of Infectious Disease, School of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, Cerqueira César, CEP 01246903, 01246, São Paulo, SP, BR

2 Department of Support, Production and Animal Health; Department of Clinic, Surgery and Animal Reproduction, Universidade Estadual Paulista, Clóvis Pestana, 793, Ipanema, CEP 16050680, 1605, Araçatuba, SP, BR

*Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* is the protozoan responsible for visceral leishmaniasis (VL), a neglected zoonosis that affects about 500,000 people a year and may be lethal if not treated. The domestic dog (*Canis lupus familiaris*) is the major reservoir of VL and exhibits highly variable clinical responses. Highly active disease is marked by increased parasite burden and immunosuppression. Here, we sought evidence for loci affecting differences in parasite load of *L. (L.) infantum* in 70 dogs from endemic area genotyped for 173,662 single nucleotide polymorphism (SNP) markers by Illumina® CanineHD BeadChip assay. Exposure to the vector was assumed upon detection of antibodies anti-saliva of the *Lutzomyia longipalpis* sand fly. Absolute parasite burden of *L. (L.) infantum* on aspirative biopsy of lymph node was quantified by real-time PCR. Phenotypes were normalized using a Box-Cox transformation, and the following linear model was applied to the trait:  $y \sim \text{mean} + \text{age} + \text{sex} + \text{vaccination} + \text{deltamethrin collar} + \text{origin} + \text{IgG anti-saliva of Lu. longipalpis level}$ . The residuals from the fitted model were used as pseudo-phenotypes for the genome-wide association (GWA) analyses, which were

performed using the EMMAX method. Only markers and samples presenting a call rate of at least 90% were considered. Additionally, SNPs with p-value for Hardy-Weinberg Equilibrium exact test lower than  $10^{-5}$  and minor allele frequency lower than 5% were removed. Markers were prioritized for investigation based on a significance level of  $1 \times 10^{-6}$ . We observed a gradual rise of parasite load associated with increasing severity of the disease ( $p < 0.01$ ). A total of 64 dogs and 105,918 SNPs passed all filtering criteria. Six SNPs were declared significant, which were in the vicinity of positional candidates likely involved resistance/susceptibility to *Leishmania* infection, such as: SOD3 on chr3 [-log(p)= 6.914] which encodes an antioxidant enzymes that catalyze the dismutation of two superoxide radicals into hydrogen peroxide and oxygen. TLR4 on chr11 [-log(p)= 6.914] encodes a toll-like receptor which plays a fundamental role in pathogen recognition and activation of innate immunity. TNFSF8 and TNFSF15 on chr11 which encodes the proinflammatory cytokine TNF. DLA-79 on chr18 [-log(p)= 6.479], which encodes MHC class Ib. CXCR4 on chr19 [-log(p)= 6.583] encodes a CXC chemokine receptor and CABIN1 on chr26 [-log(p)= 9.239] which serve as a negative regulator of T-cell receptor (TCR) signaling via inhibition of calcineurin. These findings suggest that genetic control may underlie intensity of *L. (L.) infantum* infection in dogs via immune response. **Supported by** FAPESP (2012/05847-90 and 2012/50285-9), CNPQ, CAPES and LIM-FMUSP. **Palavras-chave:** Leishmaniose visceral. Cães

### DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM ENSAIO RT-PCR SYBR GREEN EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DE ASTROVÍRUS DE GALINHA EM AVES COMERCIAIS

NÚÑEZ, LUIS FABIAN NARANJO; SANTANDER PARRA, SILVANA HIPATIA; CHAIBLE, LUCAS MARTINS; SA, LILIAN ROSE MARQUES; DA SILVA, VERA LISA GENEROSA; CARRANZA, CLAUDIA; BUIM, MARCOS; ASTOLFI-FERREIRA, CLAUDETE; FERREIRA, ANTONIO JOSE PIANTINO

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

**Introdução e objetivo:** O astrovírus de galinha (CAStV) é um vírus relacionado a síndrome do nanismo e retardo do crescimento (RSS); causa diarreia, nanismo e mortalidade. A RSS tem sido relatada no mundo todo e no Brasil o CAStV está sendo estudado como um dos principais agentes envolvidos na doença. Varias técnicas de diagnóstico têm sido utilizadas para a identificação do vírus como RT-PCR e RT-PCR em tempo real (RT-qPCR). O presente trabalho foi delineado para desenvolver e avaliar um ensaio de RT-qPCR Sybr Green destinado a identificação e quantificação do CAStV, em galinhas. **Materiais e Métodos:** Uma estirpe de CAStV isolado em ovos embrionados foi inoculada oralmente em 35 pintinhos mantidos por 42 dias em isoladores, a cada sete dias foram coletados duodeno, jejuno e íleo de cinco animais. Um fragmento do gene ORF 1b foi amplificado e clonado, para obter DNA padrão e realizar uma diluição com um número de cópias conhecida, a partir da qual foram realizadas 10 diluições seriadas com fator 10, para determinar os limites de detecção do ensaio. Primers específicos para a detecção do CAStV no RT-qPCR foram desenhados com as sequências obtidas do DNA padrão. O RNA extraído dos fragmentos de intestino foi submetido ao ensaio de RT-qPCR. Resultados: Os animais inoculados apresentaram diarreia e nanismo. A RT-qPCR para a detecção e quantificação do CAStV amplificou um fragmento de 112 pb, e conseguiu detectar e quantificar partículas virais em diluições contendo 1010 até 101 cópias do plasmídeo, mostrando uma curva com uma eficiência de 114% com um slope de -3,025, e um valor de R2 de 0,996. A curva de melting se apresentou limpa, gerando um produto específico de amplificação a 73°C, sem dímeros. Todos os fragmentos do intestino foram positivos para CAStV ao longo do experimento com maior concentração viral

aos sete dias. **Discussão:** A PCR convencional foi muito utilizada para a detecção do CAstV e a maioria de registros do vírus tem sido efetuados com o emprego desta técnica, porém só demonstraram a presença do vírus e a concentração de partículas virais presentes nas amostras. No presente trabalho foi determinada a presença e a concentração do CAstV, com maior rapidez e em concentrações ínfimas. **Conclusão:** O presente trabalho mostra que o RT-qPCR Sybr Green é sensível e específico para a detecção de CAstV e que se apresentou como um instrumento rápido e eficaz para a detecção e quantificação do vírus, com custo inferior ao dos ensaios de RT-qPCR TaqMan. **Apoio Financeiro:** CAPES - CNPq. **Palavras-chave:** Astrovírus de galinha. PCR em tempo real. RT-qPCR Sybr Green.

### PADRONIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO DE PCR TAQMAN EM TEMPO REAL PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA LARINGOTRAQUITE INFECCIOSA DAS GALINHAS

SANTANDER PARRA, SILVANA HIPATIA; NÚÑEZ, LUIS FABIAN NARANJO; BUIM, MARCOS; ASTOLFI-FERREIRA, CLAUDETE, FERREIRA, ANTONIO JOSE PIANTINO

Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo

**Introdução e objetivos:** A laringotraqueíte infecciosa (LTI) é uma doença respiratória altamente contagiosa que causa severas perdas econômicas devido à mortalidade, diminuição da produção de ovos, perda de peso e predisposição a infecções causadas por outros patógenos aviários. Diversas técnicas moleculares são utilizadas para a sua detecção e caracterização entre elas PCR, RFLP, PCR em tempo real (qPCR); sendo esta última mais sensível que os métodos tradicionais. O presente trabalho padronizou uma reação de qPCR TaqMan dirigida para a amplificação do gene da glicoproteína C (gC) visando a detecção do vírus da LTI. **Materiais e Métodos:** Vacinas TCO (Schering Plough) e CEO (Fort Dodge) foram usadas para a padronização da qPCR. A reação de qPCR usando primers e sonda TaqMan específicos para a amplificação do gene que amplifica a gC foi utilizada. Um fragmento do gene que amplifica a gC, foi amplificado e clonado, para a obtenção do DNA padrão e realizar uma diluição com um número de cópias conhecidas, a partir destas foram realizadas 10 diluições seriadas com fator 10, para determinar os limites de detecção do ensaio. Diluições seriadas com fator 10 também foram realizadas com o DNA extraído das vacinas. **Resultados:** A qPCR amplificou um fragmento de 189 pb, e detectou e quantificou partículas virais em diluições contendo 10<sup>10</sup> até 10<sup>1</sup> cópias do plasmídeo, mostrando uma curva com uma eficiência de 98 % com um slope de -3,025 e R<sup>2</sup>=0,981. No DNA extraído das vacinas foram detectados e quantificados até cinco partículas virais. As curvas de amplificação se apresentaram limpas e sem dímeros. **Discussão:** A rápida detecção do vírus da LTI pode ser de grande ajuda no controle da disseminação do vírus entre lotes vizinhos já que é uma doença altamente contagiosa e que causa grandes perdas econômicas na indústria avícola. A qPCR tem mostrado alta especificidade quando utilizada para a detecção e quantificação de diversos herpesvírus e patógenos aviários, mostrando-se de grande utilidade para o screening de amostras clínicas em estudos epidemiológicos. **Conclusão:** O presente trabalho indica a utilidade da qPCR para a detecção e quantificação do vírus da LTI podendo ser utilizada como método de diagnóstico rápido, mostrando alta sensibilidade e especificidade, detectando poucas partículas virais e com baixo número de casos falsos negativos. **Apoio Financeiro:** CNPq. **Palavras-chave:** PCR em tempo real. qPCR TaqMan. Vírus da laringotraqueíte infecciosa.

### PERFIL DE DISSOLUÇÃO DA FORMA ACABADA DO GRÂNULO COMERCIAL DO ALDICARBE (TEMIK®)

FUKUSHIMA A.R<sup>1,2</sup>, ANAZAWA, T.A<sup>2</sup>, LEONI, L.A.B<sup>2</sup>, GONZALEZ-DOMINGUES, M.V<sup>5</sup>, NICOLETTI, M.A<sup>5</sup> GONÇALVES V.J<sup>1</sup>, BERTAFGLIA, E. B<sup>1</sup>, SIQUEIRA A<sup>1</sup>, FLORIO J.C<sup>3</sup>, MAIORKA P.C<sup>4</sup>, SPINOSA H.S<sup>4</sup>.

1. Aluno do Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental e Comparada - Departamento de Patologia - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - Universidade de São Paulo (USP)
2. Professor da Universidade São Judas Tadeu (USJT)
3. Especialista de Laboratório - Departamento de Patologia - FMVZ-USP
4. Professor - Departamento de Patologia - FMVZ-USP
5. Professor da Universidade de Guarulhos (UNG)

**Introdução:** O aldicarbe, Temik<sup>150</sup>® (Bayer Cropsciences), vulgarmente conhecido como chumbinho, foi comercializado no Brasil até o ano de 2012, quando teve seu registro cancelado em função do seu uso ilícito como raticida, o que favorecia a ocorrência de intoxicações graves e fatais em animais não alvo, e até mesmo em seres humanos. Durante as análises do conteúdo estomacal de animais intoxicados e necropsiados pelo Serviço de Patologia Animal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) é comum o encontro de grânulos semelhantes ao praguicida, que após a análise toxicológica sistemática apresentam, positividade para aldicarbe. As análises utilizando conteúdo estomacal de animais, curiosamente detectaram também os seus metabólitos aldicarbe sulfóxido que apresenta dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) oral para ratos de 0,49mg/kg e aldicarbe sulfona que apresenta DL<sub>50</sub> oral para ratos de 27,0mg/kg, sendo que o primeiro metabólito é 10 vezes mais tóxico que o próprio aldicarbe (DL<sub>50</sub> oral para ratos de 5,0mg/kg). **Objetivo:** o presente trabalho avaliou a cinética de liberação do princípio ativo tóxico da forma acabada dos grânulos de Temik<sup>150</sup>®, utilizando o perfil de dissolução, a fim de avaliar a formação in vitro de seus metabólitos em meio ácido. **Materiais e métodos:** Foram avaliados os grânulos de Temik<sup>150</sup>® adquiridos no comércio. Para o perfil de dissolução foi utilizado um aparelho de dissolução Varian modelo VK7010 Dissolution System, equipado com seis cubas; cada cuba recebeu 900mL de ácido clorídrico 0,1N, a pH 3,0. O cromatógrafo foi um Agilent modelo 1200 Series High G1316A, e detector de arranjo de diodos. Foi utilizada uma coluna Zorbax Extend C18, 150X4,6mm. O volume de injeção foi de 50µL, a fim de evitar sobrecarga da coluna. O comprimento de onda selecionado para a quantificação foi de 213nm. A fase móvel utilizada foi composta por acetoneitrila e água utilizando o modo de eluição gradiente. **Resultados e discussão:** O método para separação cromatográfica produziu uma separação adequada dos analitos com resolução suficiente, tanto para identificação quanto quantificação de compostos. O perfil de dissolução dos grânulos do Temik<sup>150</sup>® em meio ácido mostrou a presença in vitro dos metabólitos aldicarbe sulfóxido e o aldicarbe sulfona, enquanto o aldicarbe para análise não mostrou a produção de metabólitos. Considerando que o aldicarbe sulfóxido apresenta maior toxicidade que a molécula de origem, este achado deve ser considerado quando se avalia a toxicidade deste praguicida. **Conclusões:** O método empregado apresentou potencial para elucidação da questão e que o metabólito do aldicarbe deve ser considerado como agravante nos quadros de intoxicação por Temik<sup>150</sup>®. **Palavras-chave:** Aldicarbe. Chumbinho. Grânulos de Temik<sup>150</sup>®.