



Resumo Expandido

Título da Pesquisa (Português): Desenvolvimento de um teste diagnóstico de infecção de aves domésticas e silvestres por <i>plasmodium juxtenucleare</i> , parasito causador da malária em aves		
Título da Pesquisa (Inglês): Development of a <i>plasmodium juxtenucleare</i> diagnostic test applied to poultry and wild birds		
Palavras-chave: malaria – aves – infecção - teste		
Keywords: malaria – birds – infection - test		
Campus: Bambuí	Tipo de Bolsa: PIBIC	Financiador: CNPq
Bolsista(s): Liomar Caetano de Oliveira Júnior e Déllis Márcia Silveira e Silva		
Professor Orientador: Gustavo Augusto Lacorte		
Área de Conhecimento: Parasitologia Animal	Edital: 051/2014	

Resumo: A infecção de aves domésticas pelo parasito *Plasmodium juxtenucleare* pode causar problemas a saúde das aves o que implica em perdas no setor produtivo de aves de corte e postura. A utilização de técnicas de diagnóstico molecular de parasitos, tem a vantagem de se avaliar dezenas amostras de uma única vez, sem a utilização de profissionais altamente especializados (raros) na identificação das espécies. Neste contexto, o presente projeto se propõe a desenvolver um diagnóstico molecular, passível de ser utilizado em larga escala, de infecção de aves domésticas e silvestres pelo parasito *Plasmodium juxtenucleare*, causador de sintomas da malária aviária em aves. O teste se baseia no desenvolvimento de um sistema de amplificação de sequências únicas de DNA de *P. juxtenucleare* por meio de uma técnica de baixo custo chamada ARMS-PCR. O projeto encontra-se em andamento com a fase de coleta de amostras para o teste já concluída. Esperamos construir o protótipo do teste até o final deste ano e realizar os testes de validação no primeiro semestre do próximo ano.

Abstract: The poultry infection by *Plasmodium juxtenucleare* may cause damages to health of birds, which implies losses to production. The use of molecular diagnosis is promising technique due to capacity of a high throughput diagnosis of samples, without the requirement of expert professionals to identify the pathogenic species. In this context, this project aims to build a molecular diagnostic test, applied to identify specifically *Plasmodium juxtenucleare* infections in poultry and wild birds. The test based on the development of a low cost amplification system able to amplify unique sequences of DNA from *P. juxtenucleare* called ARMS-PCR. The project is in progress and the first stage of collecting samples has already accomplished. We expect to end the building prototype stage later this year and perform the validation tests by the middle of next year.

INTRODUÇÃO:

As aves podem se infectar por vários parasitos do gênero *Plasmodium* sendo que a gravidade dos sintomas apresentados pelas aves depende de vários fatores incluindo qual espécie de *Plasmodium* é o agente infeccioso (Valkiunas, 2005). A infecção de aves domésticas pelo parasito *Plasmodium juxtenucleare* pode causar problemas a saúde das aves o que implica em perdas no setor produtivo de aves de corte e postura. Desta forma, é de grande importância não só identificar se aves estão infectada, mas também qual espécie de *Plasmodium* está envolvida na

infecção para se ter uma estimativa real do estado de saúde do plantel de aves sob avaliação (Souza, 1998).

A identificação usual de qual espécie de *Plasmodium* está infectando uma ave, incluindo aves domésticas, envolve a preparação e análises microscópicas de esfregaços sanguíneos que requerem a *expertise* de profissionais muito treinados na taxonomia diferencial das espécies, uma vez que o diagnóstico específico apresenta poucos caracteres disponíveis e de difícil interpretação (Oliveira, 2001).

A utilização de técnicas de diagnóstico molecular de parasitos, tem a vantagem de se avaliar dezenas amostras de uma única vez, sem a utilização de profissionais altamente especializados (raros) na identificação das espécies de patogenicidade com relevância veterinária e zootécnica (Braga et al., 2011).

Neste contexto, o presente projeto se propõe a desenvolver um diagnóstico molecular, passível de ser utilizado em larga escala, de infecção de aves domésticas e silvestres pelo parasito *Plasmodium juxtannucleare*, causador de sintomas da malária aviária em aves.

METODOLOGIA:

Para o desenvolvimento do teste diagnóstico serão utilizadas 30 amostras de sangue de *Gallus domesticus* infectadas por *P.juxtannucleare*, diagnosticadas através de análise microscópica de esfregaços sanguíneos. O método de preparação dos esfregaços bem como o diagnóstico será feito seguindo descrições de Valkiunas (2005). As amostras são obtidas das aves presentes nos aviários do IFMG-Campus Bambuí. Além das amostras infectadas por *P. juxtannucleare*, para validação do teste serão utilizadas 15 amostras sangue de *Gallus domesticus* infectadas por *P. gallinaceum* e 15 amostras de sangue sem sinais de infecção por espécies de *Plasmodium* (disponíveis no banco de DNA do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG-Campus Bambuí).

O desenvolvimento de um sistema de amplificação de sequencias únicas de DNA de *P. juxtannucleare* será baseado numa técnica chamada ARMS-PCR. Neste sistema, a amplificação só será possível se a amostra conter DNA de *P. juxtannucleare*, ou seja, infecção por este parasito. Caso inexista infecção ou infecção por outra espécie de *Plasmodium* não haverá amplificação do fragmento. Dessa forma, a detecção da infecção por meio de verificação da presença de uma banda de tamanho específico corada em gel de poliacrilamida após eletroforese.

Para validação do teste, serão submetidas a reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os iniciadores específicos para *P. juxtannucleare*, 30 amostras de DNA de aves sabidamente infectadas por *P. juxtannucleare*, 15 amostras de DNA de aves sabidamente infectadas por *P. gallinaceum* e 15 amostras de DNA de aves sabidamente livres de infecção por *Plasmodium*. O teste será considerado confiável se 100% das amostras infectadas por *P. juxtannucleare* apresentarem a banda específica no gel e se 100% das amostras infectadas por *P. gallinaceum* bem como 100% das amostras livres de infecção não apresentarem a banda específica no gel.

RESULTADOS E DISCUSSÕES:

O projeto encontra-se em andamento e até o momento da submissão deste trabalho foram coletadas cerca de 200 amostras de sangue de frangos dos aviários do IFMG Campus Bambuí para a realização dos testes. Concomitantemente, a partir da comparação de sequências de DNA específicas de *P. juxtannucleare* e de outras espécies de *Plasmodium*, está se buscando a melhor região alvo para a alocação dos oligoiniciadores para posterior síntese.

Esperamos que nos próximos dois meses já teremos definido a região ideal para a alocação dos oligoiniciadores, e até o final deste semestre teremos já sintetizado os marcadores do protótipo do teste. Com isso, estima-se que a fase de validação do protótipo ocorrerá no primeiro semestre do próximo ano.

CONCLUSÕES:

O projeto encontra-se em andamento com a fase de coleta de amostras para o teste já concluída. Esperamos construir o protótipo do teste até o final deste ano e realizar os testes de validação no primeiro semestre do próximo ano.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

BRAGA, Érika Martins et al. Recent advances in the study of avian malaria: an overview with an emphasis on the distribution of *Plasmodium* spp in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, supl. 1, p. 3-11, Aug. 2011.

Oliveira, C.E. (2001). *Criopreservação e caracterizações morfológica, morfométrica e ultra-estrutural de Plasmodium (Novyella) juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 (Apicomplexa: Plasmodiidae)*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil, 64p.

Souza, P.C.A. (1998). *Malária aviária: parasitismo por Plasmodium juxtannucleare Versiani & Gomes, 1941 em Gallus gallus L. de criações rústicas, nas mesorregiões do estado do Rio de Janeiro e aspectos Clínicos e patológicos de sua infecção experimental* Ph.D. Tese. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, Brasil, 137p.

Valkiunas, G. (2005). *Avian Malaria Parasites and Other Haemosporidia*. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Participação em Congressos, publicações e/ou pedidos de proteção intelectual:

Não existem dados para apresentação de trabalhos no momento.